

Université de Montréal

**Désordres de l'homéostasie lipidique durant le développement du
diabète non-insulino dépendant chez le *Psammomys obesus***

par

Monika ZOLTOWSKA

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctorae (PhD)

en Nutrition

décembre, 2002

© Monika ZOLTOWSKA, 2002

QU

145

U58

2003

v. 002

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Désordres de l'homéostasie lipidique durant le développement du diabète
non-insulino dépendant chez le *Psammomys obesus*

présentée par :

Monika ZOLTOWSKA

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Omar Serri
président-rapporteur

Dr Emile Levy
directeur de recherche

Dr Edgard Delvin
codirecteur

Dr Dominique Garrel
membre du jury

Dr Pierre Julien
examineur externe

Dr Omar Serri
représentant du doyen de la FES



Thèse acceptée le : _____

Sommaire

Introduction: L'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 sont des désordres interreliés. De surcroît, ils sont associés à de nombreux événements métaboliques proathérogènes. Néanmoins, les connaissances relatives à l'apport intrinsèque de chaque composante avant et après l'installation de l'hyperglycémie demeurent très limitées. En particulier, l'impact de l'état de résistance à l'insuline et du diabète sur le métabolisme lipidique et la fonction vasculaire reste mal défini. Pourtant, les perturbations à ces niveaux sont étroitement impliquées dans la genèse de l'athérosclérose. **Objectifs:** Les objectifs majeurs de notre projet ont visé à déterminer les répercussions de la résistance à l'insuline et du diabète sur le métabolisme périphérique et hépatique des lipides et la réactivité vasculaire. De plus, nos études ont exploré l'effet du diabète sur la glycosylation des LDL et sur leur influence proathérogénique. Le *Psammomys obesus* a servi comme modèle expérimental de syndrome humain de "diaobésité". **Résultats:** Premièrement, nous avons caractérisé trois groupes d'animaux selon leur niveau d'insulinémie et de glycémie : Groupe A, normoglycémique/ normoinsulinémique; Groupe B, normoglycémique/ hyperinsulinémique; et le Groupe C, hyperglycémie/ hyperinsulinémie. Deuxièmement, la transition de l'état normal à l'état diabétique est accompagnée par : a) une augmentation de poids corporel et de la masse adipeuse; b) des niveaux élevés de lipides dans la circulation, le foie et l'intestin; c) des taux augmentés d'AGL circulants; d) des anomalies dans la composition des lipoprotéines; e) des dérangements des enzymes impliquées dans l'homéostasie hépatique du cholestérol, telles que l'HMG-CoA-réductase, la 7 α -hydroxylase et l'ACAT et f) diverses perturbations du métabolisme

hépatique et intestinal menant à un assemblage et une sécrétion accrus des lipoprotéines riches en TG. De plus, nos données montrent dans le diabète une augmentation de 40 % des niveaux des LDL glucosylées caractérisées par a) des changements dans leur composition b) une plus grande capacité chemotactique vis à vis des monocytes normaux; c) une stimulation de l'estérification du cholestérol dans les macrophages et d) un effet agrégeant plus marqué. Finalement, nous avons noté des perturbations significatives de la réactivité de l'aorte thoracique en réponse à des stimuli vasoconstricteurs et vasodilatateurs chez les animaux résistants à l'insuline et diabétiques, telles qu'une augmentation de la contractilité à la phényléphrine et au KCl ainsi qu'une diminution de la relaxation au carbachol. **Conclusion:** En résumé, les états prédiabétique et diabétique se caractérisent par une dyslipidémie potentiellement athérogène, subséquente à une surproduction lipoprotéinique d'origine intestinale et hépatique et par un dysfonctionnement vasculaire. L'hyperglycémie augmente la glucosylation des LDL et, par ce biais, leur caractère néfaste. La présence concomitante de tous ces joueurs proathérogènes est propice à la genèse des complications cardiovasculaires et pourrait expliquer les taux de morbidité élevés dans la population diabétique. Par ailleurs, le *Psammomys obesus* nous semble un excellent modèle expérimental pour l'étude du syndrome de "diaobésité" en relation avec les anomalies lipidiques et vasculaires.

Mots clés : diabète, résistance à l'insuline, obésité, lipoprotéines, réactivité vasculaire, glucosylation, foie, intestin.

ABSTRACT

Introduction: Obesity, insulin resistance and type 2 diabetes are interrelated disorders. In addition, they are associated with numerous proatherogenic metabolic events. Nevertheless, our understanding of the intrinsic implication of each element, before and after the onset of hyperglycemia, remains very limited. In particular, the impact of insulin resistance and diabetes on lipid metabolism and vascular function is still imperfectly known. Yet, profound alterations at these levels are directly involved in atherogenesis. **Aim:** The main goal of our project was to determine the repercussion of insulin resistance and diabetes on peripheral and hepatic lipid metabolism and vascular reactivity. Moreover, our studies explored the impact of diabetes on LDL glucosylation and their proatherogenic influence. The *Psammomys obesus* served as an experimental model of human diabetes syndrome. **Results:** First, we characterized three groups of animals according to their plasma glucose and insulin levels: Group A, normoglycemic/normoinsulinemic; Group B, normoglycemic/hyperinsulinemic; and Group C, hyperinsulinemic/hyperglycemic. Second, the transition from normal state to diabetic state was accompanied by: a) increase in body weight and adipose tissue mass; b) high level of lipids in the liver, intestine and the circulation; c) increased plasma levels of FFA; d) disturbances in lipoprotein composition; e) derangement of hepatic enzymes regulating cholesterol homeostasis such as HMG-CoA reductase, 7 α -hydroxylase and ACAT and f) various alterations in hepatic and intestinal metabolism leading to amplified assembly and secretion of TG rich lipoproteins. Our results also illustrate that, in diabetes, there is a 40 % increase of glucosylated LDL which, furthermore, were found to a) exhibit modifications in composition; b) be more

chemotactic for normal monocytes; c) enhance cholesterol esterification in macrophage and d) display pronounced aggregating effect. Finally, our data have revealed substantial impairment in vascular reactivity assessed in thoracic aorta from insulin resistant and diabetic animals such as increased responsiveness to vasoconstrictors, phenylephrine and KCl, and reduced endothelium dependent relaxation to carbachol. **Conclusion:** Overall, prediabetic and diabetic states are characterized by a potentially atherogenic dyslipidemia, subsequent to enhanced liver and intestinal lipoprotein secretion, and vascular dysfunction. Hyperglycemia increases LDL glucosylation thus promoting their deleterious character. The concomitant presence of all of those proatherogenic agents contributes toward the development of cardiovascular complications and may explain the high levels of morbidity found in the diabetic population. Furthermore, *Psammomys obesus* seems to be an excellent model for investigating the diabetes syndrome in relation to lipids and vascular disorders.

Key words: diabetes, insulin resistance, obesity, lipoproteins, vascular reactivity, glucosylation, liver, intestine.

Table de matières

Page de titre.....	i
Page d'identification du jury	ii
Sommaire	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Dédicace	xvi
Remerciements.....	xvii
 1. Introduction.....	 1
1.1 Insuline	3
1.1.1 Biosynthèse de l'insuline.....	4
1.1.2 Sécrétion de l'insuline	6
1.1.3 Récepteur à l'insuline	8
1.1.4 Action de l'insuline.....	9
1.1.5 Effets biologiques de l'insuline.....	11
1.1.6 Glucagon et insuline.....	16
1.2 Obésité.....	16
1.2.1 Définition.....	16
1.2.2 Classification et critères diagnostiques	17
1.2.3 Prévalence.....	20
1.2.4 Étiologie	20
1.2.5 Conséquences	22
1.3 Résistance à l'insuline.....	24
1.3.1 Définition.....	24
1.3.2 Mesure de la résistance à l'insuline	24
1.3.3 Étiologie	27

1.3.3.1 L'obésité	28
1.3.4 Pathophysiologie	30
1.4 Diabète	31
1.4.1 Définition.....	31
1.4.2 Classification	31
1.4.2.1 Le diabète de type 1	32
1.4.2.2 Le diabète de type 2	34
1.4.2.3 Le diabète gestationnel	34
1.4.2.4 Les autres types particuliers.....	34
1.4.3 Critères diagnostiques	35
1.4.4 Conséquences	36
1.4.5 Diabète de type 2	37
1.4.5.1 Les principales séquences dans le développement du diabète de type 2	37
1.4.5.2 Les principales anomalies impliquées dans l'étiologie du diabète de type 2	40
1.4.5.2.1 La résistance périphérique à l'insuline	40
1.4.5.2.2 La dysfonction des cellules β et α pancréatiques	42
1.4.5.2.3 La production hépatique du glucose	44
1.4.5.3 Conséquences du diabète de type 2	45
1.4.5.3.1 Les atteintes microvasculaires	45
1.4.5.3.2 Les atteintes macrovasculaires.....	48
1.5 Syndrome métabolique et athérosclérose	50
1.5.1 Définition du Syndrome métabolique	50
1.5.2 Athérosclérose	53
1.5.2.1 Le développement de l'athérosclérose	54
1.5.3 Syndrome métabolique et athérosclérose	58
1.5.3.1 La dysfonction endothéliale.....	58
1.5.3.2 La dyslipidémie athérogénique.....	61
1.6 Métabolisme des lipides et des lipoprotéines	66
1.6.1 Lipides	66

1.6.1.1 Les acides gras.....	66
1.6.1.2 Les glycérides	67
1.6.1.3 Les phospholipides	67
1.6.1.4 Le cholestérol.....	68
1.6.2 Lipoprotéines.....	68
1.6.3 Absorption des lipides	70
1.6.3.1 La digestion des lipides	70
1.6.3.2 L'absorption des lipides par les entérocytes	73
1.6.3.3 L'assemblage et la sécrétion des chylomicrons	74
1.6.4 Transport et métabolisme des lipides	82
1.6.4.1 Les chylomicrons.....	82
1.6.4.2 Les VLDL.....	83
1.6.4.3 Les IDL.....	86
1.6.4.4 Les LDL.....	86
1.6.4.5 Les HDL	87
1.6.5 Régulation hépatique du cholestérol	93
1.6.6 Anomalies lipidiques observées dans le diabète de type 2.....	95
1.6.6.1 L'hypertriglycémie.....	96
1.6.6.2 Les concentrations abaissées des HDL-cholestérol.....	99
1.6.6.3 Les anomalies qualitatives et quantitatives des LDL ...	100
1.6.6.4 Les maladies non-alcooliques du foie gras.....	101
1.7 Modèle animal.....	102
1.7.1 <i>Psammomys obesus</i>	103
1.7.2 Développement du diabète chez le <i>Psammomys obesus</i>	104
1.7.3 Caractéristiques métaboliques des <i>Psammomys obesus</i>	105
1.7.4 Dysfonctions pancréatiques chez le <i>Psammomys obesus</i>	107
1.7.5 Avantage des <i>Psammomys obesus</i>	108
1.8 Buts et hypothèses de travail.....	111

2. Article 1: Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in <i>Psammomys obesus</i> prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia	114
--	-----

3. Article 2: Both insulin resistance and diabetes in <i>Psammomys obesus</i> upregulate the hepatic machinery involved in intracellular VLDL assembly	156
4. Article 3: Intestinal lipid transport in <i>Psammomys obesus</i> , a model of insulin resistance and type 2 diabetes	192
5. Article 4: Impact of <i>in vivo</i> glycation of LDL on platelet aggregation and monocyte chemotaxis in diabetic <i>Psammomys Obesus</i>	229
6. Article 5: Vascular responses to α -adrenergic stimulation and depolarization are enhanced in insulin resistant and diabetic <i>Psammomys obesus</i>	250
7. Discussion générale.....	278
8. Références	308

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de surpoids et d'obésité chez les adultes en fonction de l'IMC	p. 18
Tableau 2 : Catégories de tours de taille à risque de complications métaboliques...	p. 19
Tableau 3 : Principales causes de la résistance à l'insuline	p. 27
Tableau 4 : Classification étiologique du diabète	p. 32
Tableau 5 : Glycémies servant au diagnostic.....	p. 36
Tableau 6 : Caractéristiques des lipoprotéines.....	p. 69
Tableau 7 : Origine et fonctions principales des lipoprotéines.....	p. 90

Liste des figures

Figure 1 : La biosynthèse de l'insuline	p. 5
Figure 2 : La sécrétion de l'insuline.....	p. 7
Figure 3 : Le récepteur à l'insuline	p. 8
Figure 4 : Les voies de signalisation d'insuline	p. 11
Figure 5 : Les effets biologiques de l'insuline	p. 15
Figure 6 : Les principales étapes menant au diabète de type 2	p. 39
Figure 7 : Le Syndrome métabolique.....	p. 51
Figure 8 : Le développement de l'athérosclérose.....	p. 55
Figure 9 : Les voies de synthèse de triglycérides.....	p. 76
Figure 10 : L'Editing de l'ARNm de l'apo B	p. 79
Figure 11 : L'assemblage et la sécrétion des chylomicrons.....	p. 81
Figure 12 : La régulation de la sécrétion de l'apo B	p. 85
Figure 13 : Le métabolisme des lipides et des lipoprotéines.....	p. 91
Figure 14 : La régulation du cholestérol hépatique.....	p. 94
Figure 15 : Le <i>Psammomys obesus</i>	p. 110

Liste des abréviations

µg	:	Microgramme
µm	:	Micromètre
ABC1	:	ATP binding cassette 1
ACAT	:	Acyl CoA : cholestérol acyltransférase
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADP	:	Adénosine diphosphate
AG	:	Acide gras
AGL	:	Acides gras libres
Apo	:	Apoprotéine
APS	:	Adapter protein with a pleckstrin homology (PH)
ARNm	:	Acide ribonucléique messenger
ATP	:	Adénosine triphosphate
Ca	:	Calcium
CE	:	Cholestérol ester
CETP	:	Cholesteryl ester transfer protein
CL	:	Cholestérol libre
DG	:	Diglycérides
DGAT	:	Diacylglycérol acyltransférase
FABP	:	Fatty acid binding protein
g	:	Gramme
GPAT	:	Glycérol-3-phosphate acyltransférase
Grb2	:	Growth receptor binding protein -2

h	:	Heure
HDL	:	High density lipoprotein
HGPO	:	Hyperglycémie provoquée oralement
IDL	:	Intermediary density lipoprotein
IG	:	Intolérance au glucose
IMC	:	Indice de masse corporelle
IRS	:	Insulin receptor substrate
kDa	:	Kilodalton
kg	:	Kilogramme
L	:	Litre
LCAT	:	Lécithine : cholestérol acyltransférase
LDL	:	Low density lipoprotein
LH	:	Lipase hépatique
LHS	:	Lipase hormonosensible
LPL	:	Lipoprotéine lipase
m	:	Mètres
Map-kinase	:	Mitogen-activated protein kinase
MCV	:	Maladies cardiovasculaires
mg	:	Milligramme
MG	:	Monoglycérides
MGAT	:	Monoacylglycérol acyltransférase
min	:	Minutes
mmHg	:	Milimètre de mercure
MTP	:	Microsomal triglyceride transfer protein

NO	:	Monoxyde d'azote
PAI-1	:	Plasminogen activator inhibitor-1
PC	:	Phosphatidylcholine
PI3-Kinase	:	Phosphatidyl inositol 3-kinase
PKC	:	Protéine kinase C
PL	:	Phospholipides
RE	:	Réticulum endoplasmique
SH2	:	Src homology 2
SHC	:	Src homology 2 domain and collagen protein
SIRP	:	Signal regulated protein
SR-B1	:	Scavenger receptor-class B type 1
SSPG	:	Steady state plasma glucose
TG	:	Triglycérides
VLDL	:	Very low density lipoprotein

À mes parents,

pour leurs encouragements et l'amour inconditionnel

Remerciements

En premier, je tiens principalement à remercier mon directeur de recherche, le Dr Émile Lévy pour avoir cru en moi et pour m'avoir permis de me joindre à son équipe. Je ne pourrai jamais lui exprimer assez toute ma reconnaissance pour son aide, ses conseils et sa disponibilité.

Deuxièmement, j'aimerais remercier mon co-directeur, le Dr Edgard Delvin, et tous les autres chercheurs qui ont collaboré à mes travaux et qui ont su partager avec moi leur énorme savoir technique et théorique.

Je souhaiterais également remercier Carole, Louise et Manon qui dès le début m'ont accueillie à bras ouvert dans leur groupe et qui m'ont encouragée et aidée tout au long de ma maîtrise et de mon doctorat.

Je voudrais aussi remercier mon meilleur ami Bertrand surtout pour son amitié qui m'est très précieuse, mais aussi pour son aide et son énorme support moral durant toutes mes études. De plus, j'aimerais remercier tous mes autres amis pour leur soutien et encouragements.

Finalement, je tiens à souligner ma reconnaissante envers le CRM et la fondation de l'Hôpital Sainte-Justine pour l'aide financière qu'ils m'ont accordée et qui m'a permis de réaliser mes études.

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

La compréhension de la pathophysiologie de l'obésité, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 représente un défi de taille pour le 21^{ème} siècle étant donné l'incidence croissante de ces désordres métaboliques, leur association aux dyslipidémies et à l'athérosclérose, et les répercussions sur les vies humaines et la société.

L'association entre l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 est bien connue de la communauté scientifique. Toutefois, les mécanismes précis de l'interrelation de ces trois états sont très complexes, et certains aspects sont encore incompris. De façon simplifiée, l'obésité semble être la cause principale de la résistance à l'insuline qui, à son tour, est le facteur pathogénique majeur du diabète de type 2. L'hyperglycémie apparaît quand la résistance à l'insuline ne peut plus être compensée par la sécrétion d'insuline.(27) Le diabète de type 2 se développe surtout chez les personnes obèses, d'où le terme "diaobésité " proposé il y a déjà plusieurs années par Shafrir.(9,283) La prévalence du diabète est actuellement alarmante. En 1997, le nombre total d'individus atteints de diabète était évalué à 124 millions, et dans la majorité des cas (97%), il s'agissait de diabète de type 2.(3) D'après les estimations présentes, ce nombre pourrait s'élever à 221 millions en 2010 et à 300 millions en 2025.(3,174) Cette augmentation spectaculaire prend place aussi bien dans les pays industrialisés que ceux en voie de développement.(174)

Malheureusement, ces trois désordres ont un autre point commun; l'impact individuel de chacun d'entre eux sur le développement de l'athérosclérose est énorme. Cependant, une fois de plus, nos connaissances sont limitées sur certains des processus impliqués. Parmi ceux-ci figurent les perturbations lipidiques. Dans ce contexte, le but

premier de notre travail est d'étudier la contribution de l'obésité, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 aux anomalies du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, qui jouent un rôle important dans le développement des maladies cardiovasculaires.

La présente introduction vise d'abord à résumer les connaissances relatives à ces trois désordres tout en soulignant le poids respectif de leur influence métabolique.

1.1 Insuline

L'insuline joue un rôle fondamental dans la pathophysiologie de l'obésité, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. Afin de saisir l'ensemble de son étendue, nous nous proposons, dans un premier temps, de jeter un bref coup d'œil à la littérature scientifique et de se familiariser avec le terme insuline. L'insuline a été initialement connue comme une hormone hypoglycémiante dont la déficience provoque une hyperglycémie plasmatique et une hypoglycémie cellulaire. Néanmoins, sa fonction dépasse de beaucoup le simple contexte d'une hormone liée strictement à la stabilisation de la glycémie. Effectivement, l'insuline est une hormone anabolique extrêmement puissante présentant la capacité de contrôler le métabolisme intermédiaire. Elle agit surtout dans la régulation du métabolisme des glucides et des lipides tout en exerçant un effet non négligeable sur le métabolisme des protéines et des minéraux. Conséquemment, quelle que soit la voie métabolique perturbée par les anomalies de la voie insulinaire, des répercussions dévastatrices sur divers organes et sur l'homéostasie générale sont facilement notées. Cette hormone multifactorielle est synthétisée,

emmagasinée et sécrétée par les cellules β du pancréas dont les principaux aspects seront décrits dans les chapitres subséquents.(258)

1.1.1 Biosynthèse de l'insuline

La synthèse de l'insuline, une protéine de 5800 kDa, est un processus très complexe. L'ARNm de l'insuline est traduit en une molécule protéinique de 11500 kDa appelée la préproinsuline. L'élimination de la préséquence hydrophobe par des enzymes, durant l'insertion de la préproinsuline dans le réticulum endoplasmique rugueux, génère la molécule de proinsuline (9000 kDa). La proinsuline est ensuite transportée à l'appareil de Golgi où elle est conservée dans les granules de sécrétion et exposée aux diverses endopeptidases spécifiques. Ces dernières clivent le peptide-C, un des trois domaines de la proinsuline, générant par ce fait des quantités équimolaires de la forme mature de l'insuline et du peptide-C.(Voir figure 1) Une proportion de 96 % de la proinsuline est ainsi convertie. Les granules continuent leur maturation alors qu'elles traversent le cytoplasme en direction de la membrane plasmique.(258) Quand les cellules β sont stimulées de façon appréciable, l'insuline et le peptide-C libre sont sécrétés par exocytose et ils diffusent dans les capillaires sanguins des îlots.(145). Diverses études sont en cours dans le but d'investiguer le rôle dans la physiologie humaine du peptide-C, une molécule qui, actuellement, ne possède aucune activité biologique connue.(341) Néanmoins, le peptide-C revêt un intérêt clinique car le dosage de son niveau périphérique sert d'indicateur du taux de sécrétion d'insuline.(95,257) Le peu de proinsuline (4%) libérée simultanément est à 95 % moins active que l'insuline.(258) Par ailleurs, le diabète se caractérise souvent par l'augmentation de la proinsuline plasmatique, suggérant un défaut dans la biosynthèse de l'insuline.(275)

Figure 1 : La biosynthèse de l'insuline

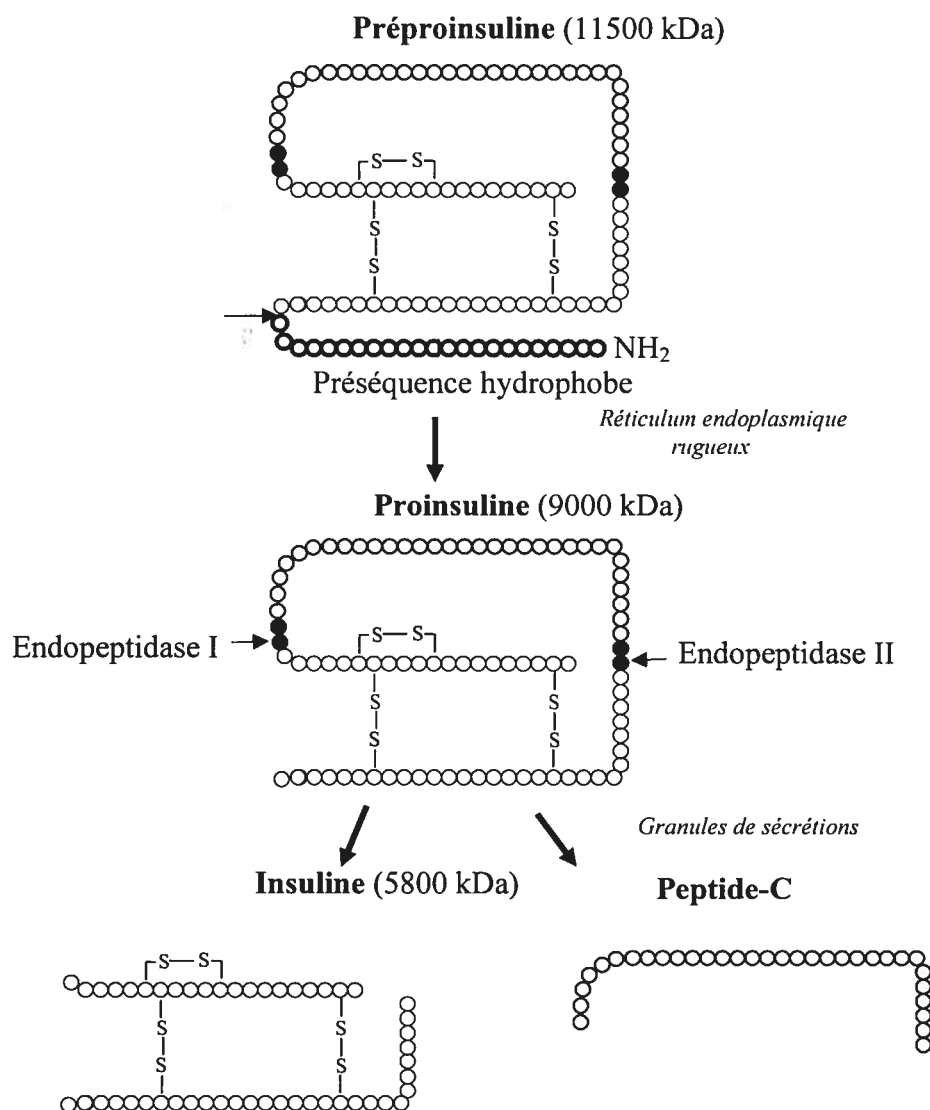


Fig. 1: La synthèse de l'insuline commence par la production d'une molécule de préproinsuline (11500 kDa). La perte de la préséquence hydrophobe de la préproinsuline, survenant lors de son insertion dans le réticulum endoplasmique, génère la molécule de proinsuline (9000 kDa). Celle-ci, transportée à l'appareil de Golgi est conservée dans les granules de sécrétion et exposée à des endopeptidases spécifiques I et II qui la clivent en insuline (5800 kDa) et en peptide C (Adapté de Kahn, 1994).

1.1.2 Sécrétion de l'insuline

La sécrétion d'insuline est étroitement contrôlée par la cellule β qui intègre diverses informations métaboliques et physiologiques dans le but d'établir le taux de sécrétion nécessaire à la régulation du métabolisme systémique. L'insuline est sécrétée en réponse à différents stimuli, l'augmentation de la concentration plasmatique de glucose étant le facteur régulateur le plus important.(145) En outre, la réponse insulinémique est contrôlée par une variété d'autres facteurs, de moindre intensité que le glucose, incluant les acides aminés, les acides gras, des hormones gastro-intestinales et de stress, et certains neurotransmetteurs.(258) Bien que les connaissances des mécanismes précis déclenchant la sécrétion d'insuline soient encore fragmentaires, certains éléments de ce processus ont été clairement identifiés. Le modèle suivant est actuellement accepté; le transfert du glucose aux cellules β par diffusion passive faisant intervenir le transporteur GLUT2 est suivi d'une étape de phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate par la glucokinase. Cette entrée de glucose dans les cellules β est proportionnelle au niveau du glucose sanguin.(217,311,233) Une augmentation du glucose intracellulaire conduit ultimement à une dépolarisation de la membrane qui résulte en un influx du Ca^{2+} extracellulaire via les canaux calciques voltage dépendant. L'augmentation du Ca^{2+} libre intracellulaire semble représenter le signal déclencheur à l'exocytose des granules sécrétoires contenant l'insuline. En effet, le Ca^{2+} induit la phosphorylation grâce à des kinases Ca^{2+} dépendantes, du cytosquelette et de certaines protéines appartenant aux membranes des vésicules contenant l'insuline, permettant ainsi la fusion des ces dernières avec la membrane plasmatique de la cellule β .(186,233) (Voir figure 2)

Figure 2 : La sécrétion de l'insuline

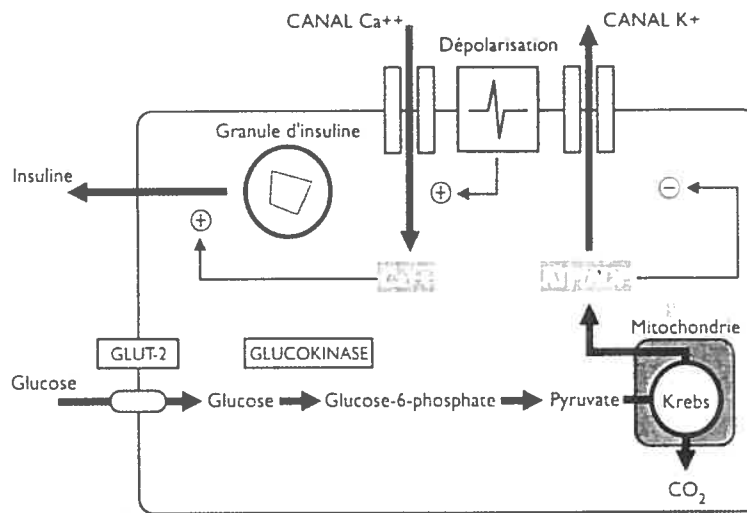


Fig. 2: L'entrée du glucose dans la cellule β , par le GLUT 2, entraîne la formation du pyruvate via la glycolyse. Le métabolisme du pyruvate, par le cycle de Krebs, conduit à une augmentation du rapport ATP/ADP, résultant en une réduction de l'efflux de potassium et en une élévation de l'influx calcique, provoquant ainsi une augmentation du calcium cellulaire. Par conséquent, le Ca^{2+} induit la sécrétion de l'insuline (Tiré de Girard, 1999).

L'amplitude de la réponse insulinémique au glucose n'est pas médiée uniquement par la concentration plasmatique du glucose, mais aussi par le taux du changement du niveau de glucose, constituant ainsi deux phases dans la sécrétion d'insuline.(258) La première phase de la sécrétion d'insuline, appelée aussi phase aiguë ou phase précoce, représente la réponse insulinémique immédiate à l'augmentation abrupte du glucose sanguin. Cette phase dure de 5 à 10 min. Par contre, la deuxième phase de la sécrétion insulinémique est caractérisée par une augmentation lente et progressive du glucose résultant en une sécrétion graduelle d'insuline. La sécrétion basale d'insuline, quant à elle, a lieu en l'absence d'une stimulation exogène. En outre, la sécrétion d'insuline ne se fait pas de façon continue, mais elle est de nature pulsatile.(258)

1.1.3 Récepteur à l'insuline

L'action d'insuline est médiée par un récepteur, décrit pour la première fois par Freychet et isolé par Cuatrecasa.(58,106) Le récepteur à l'insuline est une glycoprotéine transmembranaire et il est exprimé dans presque tous les types de cellules des vertébrés. Son nombre varie de < 40 récepteurs par cellule dans les érythrocytes circulants à $\geq 200\,000$ récepteurs par cellule dans les adipocytes.(159,355) Le récepteur à l'insuline est un récepteur à tyrosine kinase.(82) Il est composé de 2 sous-unités α et de 2 sous-unités β , unis ensemble par 3 liens disulfures. Les sous-unités α sont entièrement extracellulaires et contiennent les domaines de liaison de l'insuline. Les sous-unités β sont constituées par un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et une partie intracellulaire. Cette dernière possède les domaines de liaison de l'ATP et de la tyrosine kinase.(82,144,252) (Voir figure 3)

Figure 3 : Le récepteur à l'insuline

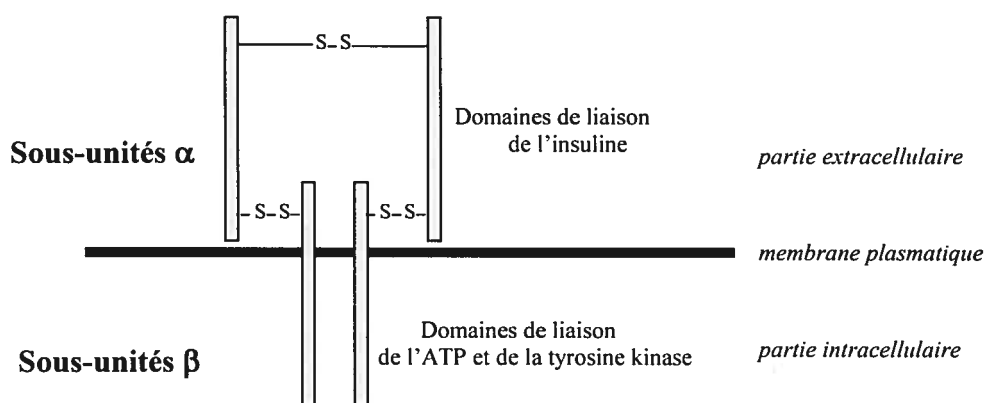


Fig. 3: Le récepteur à l'insuline est un récepteur à tyrosine kinase constitué de 2 sous-unités α et de 2 sous-unités β . Les sous-unités α extracellulaires contiennent les domaines de liaison de l'insuline. Les sous-unités β , constituées d'un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et une partie intracellulaire, possèdent les domaines de liaison de l'ATP et de la tyrosine kinase (Adapté de Dorrestijn, 1998).

1.1.4 Action de l'insuline

L'action de l'insuline sur les tissus cibles résulte d'une cascade d'agents de signalisation qui s'initie par la liaison de l'insuline à son récepteur et qui prend fin par un certain nombre de réponses biologiques. Tous les processus impliqués ne sont pas encore très bien identifiés. Dans les principaux événements biochimiques s'inscrit la liaison de l'insuline avec les sous-unités α , ce qui induit leur changement conformationnel. Une autophosphorylation des sous-unités β s'en suit, stimulant ainsi l'activité catalytique du récepteur, représentée par l'activité tyrosine kinase intrinsèque. Le récepteur activé catalyse à son tour la phosphorylation sur le résidu tyrosine d'un certain nombre de protéines cibles cytosoliques. Plusieurs de ces protéines ont été identifiées. Les plus étudiées et les plus importantes physiologiquement font partie de la famille de "*L'Insulin Receptor Substrate*" (IRS). Les autres incluent SHc, SIRP et APS.(277) Une fois phosphorylées, ces protéines agissent en tant que site de liaison à un groupe de molécules effectrices contenant un domaine non-catalytique SH2 (src homology 2). Une des molécules des plus importantes est l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase). L'activation subséquente de ce deuxième groupe de protéines qui opèrent en aval de la cascade de signalisation, modifie l'activité d'autres molécules, ce qui induit ultimement une réponse métabolique. Deux voies principales de signalisation existent; a) la voie de "*Mitogen-activated protein kinase*" (Map kinase), activée par la liaison d'IRS ou Shc avec Grb2. Cette voie des Map kinases est assez puissante dans la régulation des effets mitogéniques de l'insuline, et b) la deuxième voie majeure est celle de PI3-kinase et elle contrôle les actions métaboliques de l'insuline. L'association d'IRS-1 avec PI3-kinase semble jouer un rôle primordial dans la stimulation par l'insuline de la translocation du GLUT4 et de la synthèse du

glycogène.(82,144,277)(Voir figure 4) L'importance de PI3-kinase dans ce processus a été mise en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la PI3-kinase. Ces inhibiteurs neutralisent, en effet, la translocation du GLUT4 stimulée par l'insuline.(164,244) Cependant, des travaux additionnels sont nécessaires pour élucider les mécanismes par lesquels l'activation de PI3-kinase conduit à la translocation de GLUT4. Actuellement, on s'aperçoit qu'à l'intérieur d'une cellule, la divergence des voies de signalisation par l'insuline et de ses actions subséquentes réside au niveau des protéines de liaison.(82,144,27) Par ailleurs, les molécules stimulant la phosphorylation sur les résidus sérine/thréonine de l'IRS-1 ou autres protéines effectrices en aval des voies de signalisation, inhibent l'action de l'insuline.(188,203) Par exemple, l'activation de la protéine kinase C (PKC) se traduit par la phosphorylation des résidus sérine/thréonine et de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase. D'autre part, plusieurs études ont constaté que l'hyperglycémie active la PKC, ce qui se traduit par une diminution de l'action de l'insuline.(188,358) Ces observations sont très importantes, car une réduction de l'activité tyrosine kinase est observée chez les sujets diabétiques et semble être à l'origine de la résistance à l'insuline.(6)

Figure 4 : Les voies de signalisation d'insuline

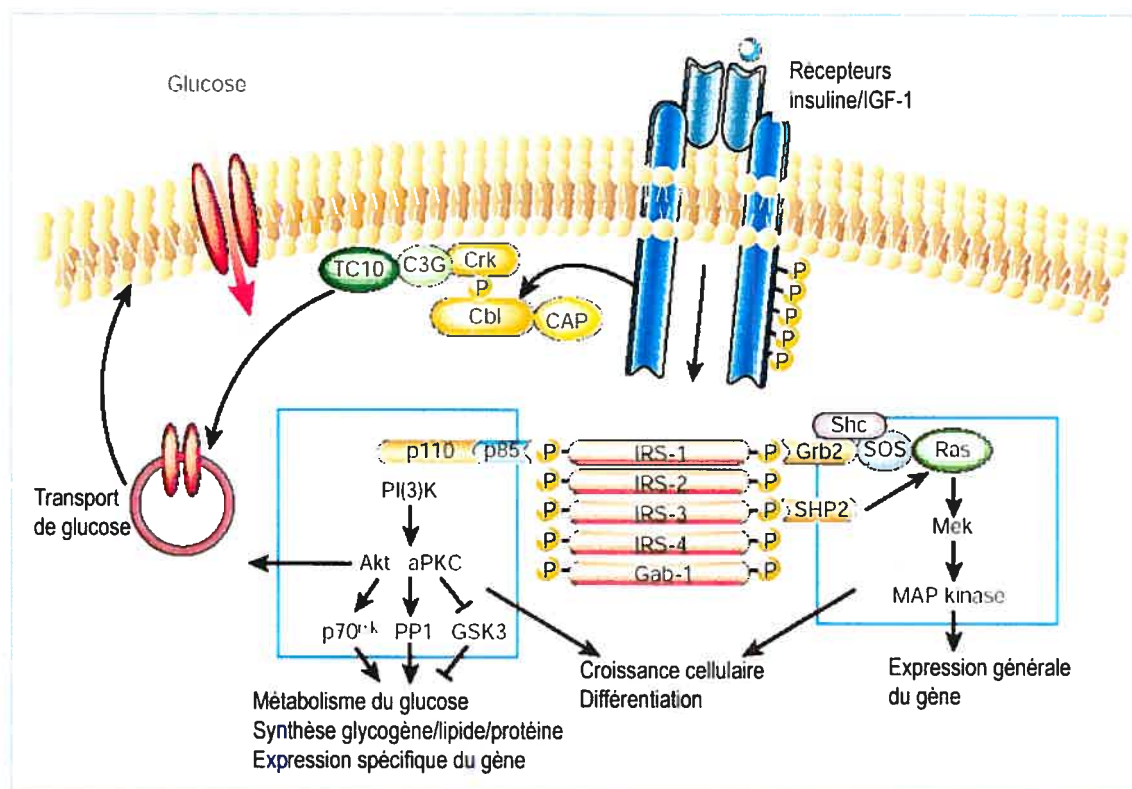


Fig. 4: Les deux principales voies de signalisation d'insuline sont 1) la voie impliquant Shc/Grb2/Ras/Map kinase et 2) la voie de PI(3)K. En premier lieu, le récepteur à l'insuline, une fois activé, catalyse la phosphorylation des protéines IRS et Shc. Ces dernières activent, à leur tour, d'autres protéines opérant en aval de la cascade de signalisation, ce qui résulte ultimement en une réponse métabolique. Par ailleurs, la voie de Cbl travaille en parallèle avec celle de PI(3)K pour promouvoir le transport de glucose (Tiré de Saltiel, 2001).

1.1.5 Effets biologiques de l'insuline

Le maintien de l'homéostasie du métabolisme du glucose implique une interaction complexe entre les niveaux de glucose circulant, les hormones pancréatiques, les nutriments ainsi que la distribution et l'échange des divers substrats entre les différents tissus. L'insuline est l'hormone clé de la régulation du métabolisme du

glucose à la fois dans les conditions de jeûne et post-prandiales. Par ailleurs, elle s'inscrit comme modulateur de la régulation du métabolisme intermédiaire. (Voir figure 5) Toutefois, les effets sur le métabolisme des lipides et des protéines sont associés ou résultent de la régulation du glucose. Les tissus musculaire, hépatique et adipeux représentent les trois cibles principales des effets métaboliques de l'insuline. (188,277)

Dans les conditions post-prandiales, la sécrétion de l'insuline diminue le taux du glucose sanguin en agissant en premier lieu sur son transport membranaire. En effet, le glucose est transporté dans les cellules cardiaques, adipeuses et musculaires lisses par diffusion facilitée par le transporteur GLUT4. C'est à ce niveau que l'insuline agit en stimulant la translocation du GLUT4, localisé dans les nombreux pools intracellulaires, à la membrane plasmique interne. (144) Environ 70 à 80 % de ce glucose est pris par le muscle squelettique. (176) Nous pouvons facilement comprendre qu'une perturbation de l'effet de l'insuline à ce niveau, comme c'est le cas dans la résistance à l'insuline, aura des portées graves sur la glycémie plasmatique. Soulignons que la translocation des transporteurs GLUT dans les autres tissus, tel que GLUT2 dans le foie et le pancréas, n'est pas induite par l'insuline. (144)

Quant au métabolisme cellulaire, l'insuline stimule l'oxydation du glucose et son stockage sous forme de glycogène. L'implication directe de l'insuline dans le contrôle de la glycogénogénèse a été démontrée par divers investigateurs, et ce dans les cellules musculaires et hépatiques. D'après ces travaux, l'insuline augmente l'activité de la glycogène synthase, une enzyme clé dans la synthèse du glycogène. (132,277,280) En parallèle, l'insuline inhibe la production et la sécrétion hépatique du glucose en bloquant les processus de gluconéogenèse et de glycogénolyse. Cette action est exercée par un effet direct sur le foie ou indirectement en jouant sur la disponibilité des substrats

gluconéogéniques. L'effet direct est vraisemblablement via la modulation de l'activité de diverses enzymes et de l'expression des gènes codant pour les enzymes hépatiques de la gluconéogenèse et de la glycolyse.(277) Des études élégantes ont en effet confirmé l'inhibition par l'insuline de la transcription des gènes codant pour la phosphoenolpyruvate carboxykinase (enzyme limitante de la gluconéogenèse), le fructose-1,6-bisphosphatase et le glucose-6-phosphatase ainsi que de l'augmentation de la transcription des enzymes glycolytiques (la glucokinase et la pyruvate kinase), et des enzymes lipogéniques ("*fatty acid synthase*" et "*acetyl-CoA carboxylase*").(50,88,89,132,144,169,170,239,240,241,302,307,368)

Le métabolisme lipidique est, lui aussi, fortement influencé par l'insuline. Cet aspect reste malheureusement encore peu connu. Pourtant, connaissant l'association entre la résistance à l'insuline et les dyslipidémies, il serait intéressant d'investiguer ce rapport de manière plus détaillée. Actuellement, nous savons que l'insuline est à la fois un puissant activateur de la lipogénèse et un puissant inhibiteur de la lipolyse. Soulignons d'abord que l'insuline est nécessaire à la modulation de la lipoprotéine lipase (LPL). La LPL est une enzyme synthétisée par les adipocytes et dont l'activité est en corrélation directe avec le pouvoir du tissu adipeux à incorporer les acides gras. Les études effectuées sur les adipocytes isolés et mis en culture ont, en effet, démontré que l'insuline augmente l'activité de la LPL ainsi que sa sécrétion.(7,47,256,260) Simultanément, au niveau des adipocytes, l'insuline inhibe l'activité de la lipase hormonosensible (LHS), l'enzyme clé de la lipolyse, limitant ainsi la libération des acides gras et du glycérol.(179) Par ce double mécanisme, l'insuline diminue la concentration des acides gras libres et promeut l'entreposage des triglycérides. De plus, les adipocytes contiennent très peu de glycérol kinase et par conséquent dépendent d'un

apport en glucose pour assurer la présence de glycérol-3-phosphate nécessaire à la réaction d'estérification des triglycérides. Rappelons que cette entrée de glucose est conditionnée par la présence de l'insuline.(258) En outre, l'insuline peut rehausser l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides. Le traitement des adipocytes humains en culture avec l'insuline, a démontré clairement une augmentation de l'activité de la "*fatty acid synthase*" et de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase.(225)

Dans les conditions de jeûne, l'insuline joue indirectement un rôle important dans la physiologie du glucose par le biais de la diminution des ses effets inhibiteurs sur la glycogénolyse, la lipolyse et la protéolyse. Ainsi, après une nuit de jeûne, l'insuline circulante est abaissée, ce qui diminue à son tour l'utilisation du glucose par les tissus insulino-dependants. Le métabolisme s'oriente doucement vers l'utilisation des acides gras libres. Ces derniers sont mobilisés du tissu adipeux, car l'effet inhibiteur de l'insuline est levé.(258) C'est à ce moment là que la consommation du glucose par plusieurs organes est ralentie en faveur du cerveau. Le foie est au centre de ces processus métaboliques puisqu'il produit, via la glycogénolyse et la gluconéogenèse du glucose en quantité nécessaire, chacune des deux voies contribuant à 50 % du rendement total. L'enclenchement de ces deux processus est possible à cause de la diminution de l'effet inhibiteur de l'insuline. Évidemment, le taux de production de glucose dépend de la disponibilité du glycogène hépatique et des précurseurs gluconéogéniques (lactate, alanine et glycérol). Environ 80% de ce glucose sécrété par le foie est métabolisé essentiellement par le cerveau, mais aussi par l'intestin et les globules rouges (ces tissus étant indépendants de l'insuline). Même si le muscle est le principal réservoir de

glycogène, devant le foie, il ne possède pas de glucose-6-phosphatase pour mobiliser le glucose et contribuer à l'homéostasie du glucose plasmatique.(258)

En ce qui concerne les protéines, nous pouvons dire que, l'insuline avantage leur anabolisme net. Tout d'abord, l'insuline stimule le taux de la synthèse des protéines.(173) Elle agit probablement à l'étape de l'initiation de la synthèse, en augmentant le nombre initial des ribosomes.(208) Simultanément, elle bloque la protéolyse.(277)

Figure 5 : Les effets biologiques de l'insuline

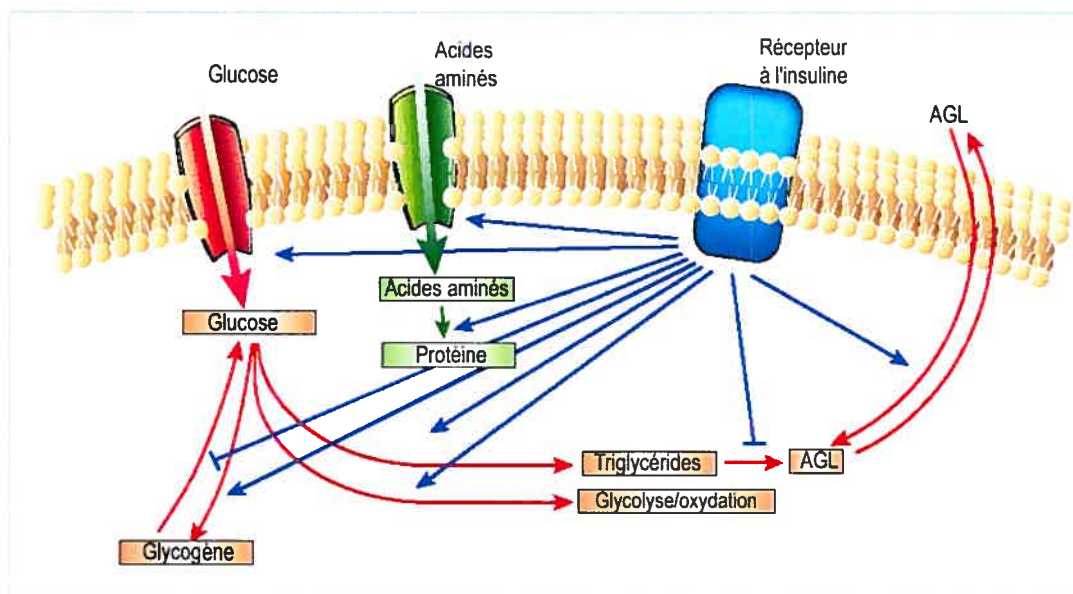


Fig. 5: L'insuline exerce diverses actions anaboliques. Elle stimule la captation et le stockage du glucose, des acides aminés et des acides gras. Simultanément, elle réprime la dégradation du glycogène et des triglycérides (Tiré de Saltiel, 2001).

1.1.6 Glucagon et insuline

Le glucagon est une autre hormone très importante dans la régulation physiologique du métabolisme du glucose. Il est produit et sécrété par les cellules pancréatiques α . Les concentrations abaissées de la glycémie déterminent en grande partie l'ampleur de la sécrétion du glucagon. Le rôle principal du glucagon consiste à bloquer la glycolyse hépatique et à promouvoir la glycogénolyse et la gluconéogenèse. L'effet final de ces processus est une augmentation de la production du glucose et une élévation de la glycémie plasmatique. La compréhension des effets antagonistes de l'insuline et du glucagon au niveau hépatique est primordiale dans l'appréciation de la physiopathologie. Les deux hormones sont présentes ensemble dans le plasma et leurs concentrations relatives plutôt qu'absolues déterminent la production du glucose et par le fait même la glycémie.(191,258)

1.2 Obésité

1.2.1 Définition

L'obésité est une maladie chronique impliquant l'interaction complexe des facteurs environnementaux (sociaux et culturels), génétiques, physiologiques, métaboliques, psychologiques et comportementaux. Plus précisément, c'est un état caractérisé par un excès de poids dû à une amplification du tissu adipeux, qui à son tour, a des effets adverses sur la santé.(367)

La masse du tissu adipeux blanc dépend de la taille et du nombre d'adipocytes qui le forment. Pour répondre à l'entreposage excessif de l'énergie sous forme de triglycérides, les adipocytes sont capables de changer leur diamètre de 20 fois et leur volume de 1000 fois. En outre, il a été démontré que lorsque les adipocytes atteignent la

taille maximale, de nouveaux adipocytes sont recrutés à partir des préadipocytes.(107) Le développement de tissu adipeux a lieu essentiellement en période postnatale. Aussi bien le nombre que la taille de la population adipocytaire restent relativement constants chez une personne adulte mince. Toutefois, l'augmentation excessive de la masse adipeuse tout au long de la vie peut faire intervenir à la fois l'hypertrophie et l'hyperplasie cellulaire. Selon le concept général, l'obésité chez l'enfant et l'adolescent est hyperplasique, tandis que l'obésité chez l'adulte est hypertrophique.(61) Par ailleurs, il faut souligner que cette capacité du tissu adipeux à l'expansion peut avoir des conséquences métaboliques très graves car, comme nous allons le voir plus tard, son excès est étroitement corrélé avec le risque de développer des maladies telles que le diabète.

1.2.2 Classification et critères diagnostiques

En pratique clinique, comme en épidémiologie, l'obésité est définie à partir de l'indice de masse corporelle (IMC). L'IMC se calcule en faisant le rapport du poids (exprimé en kg) sur le carré de la hauteur (en m) (kg/m^2). La définition de surpoids et de l'obésité par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est basée non seulement sur les risques élevés de mortalité, mais aussi sur les risques de morbidité qui y sont associés. L'obésité débute à partir d'un $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$.(367) La classification proposée par L'OMS est résumée dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Classification de surpoids et d'obésité chez les adultes en fonction de l'IMC

Classification	IMC (kg/m ²)	Risques de co-morbidités
Insuffisance pondérale	< 18.5	Faibles (mais risques plus élevés pour d'autres problèmes cliniques)
Valeurs normales	18.5 – 24.9	Moyens
Surpoids	25.0 – 29.9	Certains risques
Obésité	> 30.0	
• Classe I	30.0 – 34.9	Modérés
• Classe II	35.0 – 39.9	Élevés
• Classe III	> 40.0	Très élevés

(Adapté de l'OMS,1999)

La relation entre les différents niveaux d'IMC et les risques de co-morbidité peut varier entre les populations. Par exemple, la population asiatique présente un risque absolu plus élevé de diabète de type 2 que la population caucasienne, et ce pour un même niveau d'IMC. Pour cette raison précise, il est recommandé d'utiliser des niveaux d'IMC plus bas pour la population asiatique que pour la population caucasienne dans la détermination des risques de morbidité.(336)

Cependant, l'excès du tissu adipeux observé au cours de l'obésité ne suffit pas toujours à induire des effets néfastes sur la santé. En effet, depuis les premiers travaux réalisés par Jean Vague en 1949, la communauté scientifique s'est rendue à l'évidence que la distribution régionale de la masse adipeuse est le déterminant prépondérant de la prévalence et de la sévérité des complications liées à l'obésité.(329) De nombreux investigateurs ont, en effet, démontré l'association entre l'augmentation du tissu adipeux au niveau de l'abdomen, et surtout au niveau des viscères, et l'augmentation de risque de

maladies cardiovasculaires (MCV).(45,223) Actuellement l'obésité androïde, un marqueur indirect de la graisse viscérale, est regardée en tant que facteur de risque indépendant en relation avec diverses atteintes vasculaires et métaboliques. Dans ce contexte, l'évaluation de l'obésité viscérale devient un enjeu de première importance. Les techniques de l'imagerie à résonance magnétique et la tomodensitométrie assistée par ordinateur présentent le plus de précision quant à l'estimation de tissu viscéral. Par contre, elles sont très coûteuses et peu accessibles. Le recours à des simples mesures anthropométriques s'avère donc nécessaire. L'IMC, demeurant une mesure fiable pour quantifier l'adiposité totale, ne renseigne pas sur la distribution de la masse adipeuse. Lean et coll. ont suggéré l'utilisation de la mesure du tour de la taille dans l'évaluation de risques liés à l'obésité.(189) Les catégories proposées par cette équipe sont résumées dans le tableau 2:

Tableau 2: Catégories de tours de taille à risque de complications métaboliques.		
	Niveau 1 : Risques élevés	Niveau 2 : Risques très élevés
Hommes	≥ 94 cm	≥ 102 cm
Femmes	≥ 80 cm	≥ 88 cm

Plus précisément, le niveau 1 devrait alerter le clinicien à la présence potentielle de risques. Le niveau 2 devrait signaler au clinicien la nécessité d'entreprendre des actions thérapeutiques. D'après plusieurs investigateurs, cette mesure simple et facile à utiliser est très appropriée dans l'identification des sujets à risques de MCV.(135,190)

1.2.3 Prévalence

Aux États-Unis seulement, le pourcentage d'adultes (20 à 80 ans) présentant un surplus de poids est estimé à 54.9 % et d'obésité à 22.3%.(100,101) La prévalence de l'obésité au Canada est de 13.5% de la population totale.(23) En France, on estime que 8 à 10 % de la population adulte et 10 % des enfants présentent une obésité.(18) Ce sont en général les pays industrialisés qui montrent les taux d'obésité les plus élevés. Toutefois, l'obésité augmente rapidement même dans les pays en voie de développement où paradoxalement elle coexiste avec la sous-alimentation.(177) Plus inquiétant encore est la proportion en constante progression de personnes atteintes d'un excès de poids et d'obésité dans les nombreux pays du monde. Le taux d'obésité augmente virtuellement dans l'ensemble des ethnies, races, et populations de différents statuts socio-économiques, niveaux d'éducation, et auprès des deux sexes et de tous les groupes d'âge.(177)

1.2.4 Étiologie

L'obésité s'installe dès que l'apport alimentaire est excessif comparé aux dépenses énergétiques. Ces dernières incluent plusieurs composantes, telles que le métabolisme basal, qui compte pour 60 à 70 % de la dépense énergétique totale journalière, la thermogenèse qui compte pour 10 %, et l'activité physique qui, elle, compte pour 20 à 30% de cette dépense. Conséquemment, la balance énergétique positive qui est responsable du développement de l'obésité peut donc être causée par un apport énergétique trop élevé par rapport aux besoins ou par une dépense énergétique réduite ou par la combinaison des deux.(61)

Tout d'abord, l'obésité peut être causée par des anomalies métaboliques et génétiques bien identifiées. Tel est le cas pour les obésités neuroendocriniennes de la maladie de Cushing, la maladie des ovaires polykystiques ou l'hypothyroïdie. L'obésité peut aussi résulter de certaines atteintes de la région hypothalamique incluant des tumeurs, des traumatismes crâniens et l'inflammation. L'obésité est aussi un trait caractéristique de certains syndromes génétiques ou congénitaux tels que les syndromes de Prader-Willi et de Laurence-Moon-Biedl. Finalement, l'état de l'obésité peut découler de mutations monogéniques, telles que des mutations des gènes de la leptine, du récepteur à la leptine, et autres.(61)

Cependant dans la majorité des cas nous faisons face à l'obésité multifactorielle, appelée l'obésité commune. D'après les études, portant sur les jumeaux, la prédisposition génétique joue un rôle important sur la détermination du poids corporel, et donc par le fait même sur l'apparition de l'obésité.(31,32) Toutefois, selon les experts de l'OMS la susceptibilité génétique ne peut, à elle seule, expliquer l'ampleur de la prévalence d'excès de poids et d'obésité observée à l'échelle mondiale. De nombreux chercheurs, qui se sont penchés sur cette thématique, pensent que les causes fondamentales de l'augmentation de l'obésité se trouveraient plutôt dans l'évolution des modes de vie et des comportements. Plus précisément, l'environnement actuel qui, d'une part, promeut la sédentarité, et d'autre, procure une trop grande quantité de nourriture, en serait la cause principale.(259) Le meilleur exemple est représenté par les Indiens Pima qui possèdent les taux d'obésité et de diabète très élevés. En effet, les Indiens Pima vivant aux États Unis pèsent en moyenne 25 kg de plus que les Indiens Pima vivant au Mexique. Cet exemple montre bien que l'héritage génétique peut être influencé par l'environnement.(265) Une autre étude, portant cette fois-ci sur les aborigènes

d'Australie, a démontré chez cette population que le retour à un style de vie traditionnel était accompagné par une diminution du poids corporel.(243) De nombreux chercheurs tentent de définir les facteurs précis qui rendent notre style de vie industrialisée si prompt au développement d'obésité. Actuellement, les principaux d'entre eux seraient l'alimentation riche en lipides et le manque d'exercice physique.(34,286)

1.2.5 Conséquences

Le terme "obésité" fait partie aujourd'hui du langage courant. Peu de gens, cependant, connaissent sa vraie définition, son importance et surtout son impact négatif sur la santé. L'aspect esthétique et socioculturel prime présentement sur ses conséquences médicales. Pourtant, l'obésité peut et doit être considérée comme une condition chronique sévère qui nécessite des soins médicaux et un suivi longitudinal, car l'obésité est en soi un facteur de risque indépendant et un déterminant majeur de nombreuses maladies non-transmissibles.(336) Les anomalies métaboliques dues à un surplus de tissus adipeux sont à la base des facteurs de morbidité et des complications reliés à l'obésité. Parmi les plus importantes, on retrouve le diabète de type 2, l'hypertension et l'athérosclérose. Malheureusement, les conséquences de l'obésité ne se limitent pas à ces pathologies. L'obésité est, en effet, un facteur de risque de développer diverses atteintes, dont les plus notables sont :

1. Certains types de cancer, tels que le cancer de sein, de l'œsophage, du colon, du rectum, d'endomètre et des reins.
2. Complications respiratoires tels que le syndrome d'apnée du sommeil et le syndrome d'hypoventilation.
3. Atteintes rhumatologiques et ostéo-articulaires

4. Maladies de la vésicule biliaire.
5. Stéatose hépatique non alcoolique.
6. Complications obstétriques et gynécologiques (infertilité et le dérangement du cycle menstruel).
7. Complications psychosociales (dépression, discrimination).
8. Complications chirurgicales (risque plus élevé d'infections et de thrombose).
9. Altérations dans la production et le métabolisme des stéroïdes sexuels, en particulier dans l'obésité viscérale.

Il est important d'ajouter que l'obésité peut aussi aggraver ou accélérer la progression d'une pathologie déjà présente. De plus, toutes les complications mentionnées sont plus fréquentes chez les sujets dont la circonférence abdominale est élevée, d'où l'importance d'employer l'obésité androïde comme indicateur supplémentaire pour déterminer le risque des maladies non-transmissibles.(18)

Comme nous venons de le voir, l'obésité est accompagnée par diverses maladies. Par ailleurs, son association avec le diabète de type 2 est parmi les plus importantes. En effet, diverses études, dont celle menée par Wannamethee et Shaper, ont observé une corrélation significative entre le degré et la durée de l'obésité et le risque de développer le diabète.(344,94,104) D'après l'étude de Colditz et coll., portant sur 113861 femmes avec un suivi de 8 ans, le risque relatif de développer le diabète augmente déjà à partir d'un IMC = 22.(53) Inversement, chez les diabétiques, une diminution du poids corporel améliore la glycémie et la sensibilité à l'insuline.(364) Ces éléments soulignent l'importance du rôle de l'obésité dans la genèse du diabète.

D'après les connaissances actuelles, la résistance à l'insuline serait probablement le lien causal entre l'obésité et le diabète. Nous nous proposons donc de faire un aperçu de cet état pathologique dans le chapitre suivant.

1.3 Résistance à l'insuline

1.3.1 Définition

L'insuline produit tout un éventail d'effets biologiques sur les processus métaboliques et mitogéniques. Cependant, le terme de résistance à l'insuline s'applique à l'effet amoindri de l'insuline sur l'entrée du glucose dans les tissus insulino-sensibles, tels que le muscle et le tissu adipeux, et sur son utilisation subséquente. La résistance à l'insuline est donc un état pathophysiologique dans lequel des niveaux normaux ou élevés d'insuline produisent des effets biologiques atténués. Les manifestations cliniques de la résistance à l'insuline sont l'hyperinsulinémie et l'intolérance au glucose. La résistance à l'insuline ne doit pas être confondue avec le syndrome de la résistance à l'insuline, car ce dernier représente un ensemble de désordres et anomalies biochimiques qui seront discutés subséquemment.(43)

1.3.2 Mesure de la résistance à l'insuline

La présence de la résistance à l'insuline peut être détectée par une variété des procédures, chacune possédant des avantages et des désavantages ou des limites.(75,97) Nous nous attarderons en particulier sur cinq techniques qui ont reçu l'attention de la part de la communauté scientifique.

1. La technique des clamps euglycémiques – hyperinsulinémiques

Actuellement, la technique des clamps euglycémiques – hyperinsulinémiques, développée par DeFronzo et coll. est considérée comme la méthode de référence. Elle consiste à infuser de l'insuline exogène (dépassant ainsi la concentration plasmatique à jeun) pendant qu'on infuse le glucose à des taux variables dans le but de le maintenir à un niveau fixé. La quantité de glucose infusée sur une période donnée est l'index de l'action d'insuline sur le métabolisme de glucose. Bien que cette technique soit très fiable, elle est trop complexe et coûteuse pour être utilisée dans les études cliniques à grande échelle.(73,75)

2. Le homeostasis model assessment (HOMA)

Le deuxième test de la sensibilité à l'insuline est le "*homeostasis model assessment*" (HOMA). Dans ce cas, la sensibilité à l'insuline est estimée à partir d'un modèle mathématique qui prend en compte les concentrations plasmatiques basales du glucose et d'insuline.(219) L'étude de Bonora et coll. portant sur 115 sujets a prouvé la pertinence de ce test dans l'évaluation de la sensibilité à l'insuline *in vivo* chez l'humain.(29)

3. Le test de suppression insulinique par la somatostatine

Une autre méthode d'évaluation de la sensibilité à l'insuline est le test de suppression insulinique par la somatostatine. Elle consiste à infuser de la somatostatine afin de bloquer la sécrétion endogène de l'insuline. En même temps, le glucose et l'insuline sont perfusés simultanément à débits fixes. L'équilibre glycémique obtenu en fin de test, appelé le SSPG (*steady state plasma glucose*), sera inversement proportionnel au degré

de sensibilité tissulaire à l'insuline.(136a) Ce test minimise le risque d'hypoglycémie et des effets de la contre régulation hormonale due à celle-ci. De plus, les résultats obtenus présentent une bonne corrélation avec les observations émanant des clamps euglycémiques – hyperinsulinémiques.(138a)

4. Le minimal model de Bergman

Cette méthode consiste à provoquer une hyperglycémie par voie intraveineuse par l'injection d'un bolus de glucose. Par la suite, les niveaux plasmatiques de glucose et d'insuline sont mesurés fréquemment à des intervalles réguliers, le tout sur une période de plusieurs heures. Les résultats sont entrés dans l'ordinateur qui génère, selon la modélisation mathématique de Bergman de la cinétique des glycémies et des insulinémies, une valeur représentant l'index de la sensibilité à l'insuline.(20a) Cette mesure est très fiable chez les sujets non -diabétiques, mais sa précision diminue chez les sujets diabétiques.(51a,98a)

5. Le test de l'insuline à jeun

Finalement, le test le plus pratique de point de vue clinique est la mesure des niveaux plasmatiques de l'insuline à jeun. En utilisant les clamps euglycémiques, il a été démontré que les niveaux de l'insuline à jeun présentent une corrélation significative avec l'action d'insuline.(97,55,278)

Toutefois, l'utilité de tous ces tests est limitée par le fait qu'il existe une grande variabilité à la sensibilité à l'insuline entre les individus normaux. Il est donc très

difficile de cerner les valeurs précises qui définissent l'état de la résistance à l'insuline.(75,97)

1.3.3 Étiologie

Les causes de la résistance à l'insuline peuvent être regroupées en quatre catégories générales résumées dans le tableau 3.(103)

Tableau 3 : Principales causes de la résistance à l'insuline
1. Modification des produits de sécrétion de la cellule β
2. Présence d'antagonistes d'insuline dans la circulation systémique : <ul style="list-style-type: none"> ▪ De nature hormonale : le cortisol, les catécholamines, l'hormone de croissance et le glucagon. ▪ Des anticorps anti-insuline et anti récepteur à l'insuline. ▪ Autres : les AGL circulants, le TNF-α, la resistine, et selon certaines études, la leptine.
3. Défauts dans les tissus cibles
4. Accès altéré de l'insuline aux tissus cibles

L'état de la résistance à l'insuline peut être dû à des causes génétiques et/ou acquises.(27) Les causes génétiques incluent des mutations relatives aux gènes du récepteur à l'insuline, de l'IRS-1 et de l'enzyme glycogène synthase. Cependant, les mutations identifiées à ce jour peuvent expliquer moins de 5% de tous les cas de la résistance à l'insuline.(27) Les causes acquises de la résistance à l'insuline sont beaucoup mieux connues et incluent principalement l'obésité.(356)

1.3.3.1 L'obésité

La résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie sont des traits caractéristiques de l'obésité humaine. Leur association est très forte mais les liens de causalité de cette relation sont loin d'être élucidés.(27) L'étude de Ferrannini et coll, portant sur 1146 sujets de deux sexes, âgés de 18 à 85 ans, a démontré une corrélation négative entre la sensibilité à l'insuline et la masse adipeuse.(98) La question est maintenant de savoir comment le tissu adipeux en excès affecte la sensibilité à l'insuline dans le tissu musculaire, adipeux et hépatique. Une des hypothèses implique le rôle prépondérant des molécules secrétées par les adipocytes eux même. Ces derniers sont des cellules plurifonctionnelles se spécialisant dans le stockage des réserves énergétiques sous forme de triglycérides et leur mobilisation sous forme d'acides gras libres et de glycérol. Par ailleurs, le tissu adipeux est capable de communiquer et d'interagir avec la périphérie et le système nerveux central en produisant de nombreux facteurs aux actions autocrines, paracrines ou endocrines.(107,157) Les études, chez les rongeurs principalement, ont observé que certains de ces facteurs exerçaient des effets inhibiteurs sur la sécrétion et la signalisation d'insuline. De surcroît, leur concentration était souvent altérée dans les modèles d'obésité. Parmi les molécules qui ont suscité beaucoup d'intérêt, mentionnons la leptine, le facteur de nécrose tumoral α (TNF- α), la résistine, et tout récemment la protéine Agouti et l'adipsine. Cependant, leur contribution respective au développement de la résistance à l'insuline n'est pas encore très bien définie, et aucune d'entre elles n'apporte l'explication définitive au lien qui associe l'obésité à la résistance à l'insuline.(107,157,218)

Par ailleurs, beaucoup d'études imputent une importance aux acides gras libres dans le développement de la résistance à l'insuline et divers mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Le premier d'entre eux était suggéré par Randle et coll.(264) D'après son hypothèse les AGL stimulent, au niveau du muscle squelettique, l'oxydation lipidique et inhibent la pyruvate déshydrogénase, l'enzyme clé de l'oxydation des glucides. Il en résulte une résistance périphérique à l'insuline par suite d'une utilisation diminuée de glucides comme source d'énergie. Cependant, certaines observations suggèrent que les AGL inhibent l'action de l'insuline en agissant à d'autres niveaux du métabolisme des glucides. Il a été démontré que les concentrations élevées des AGL, induisaient, dans le muscle squelettique des sujets sains, une diminution du transport et de phosphorylation du glucose, ainsi qu'une diminution de la synthèse du glycogène.(26,270) Plus précisément, les AGL interféraient avec le transport de glucose via un effet inhibiteur sur l'activité de la PI-3-kinase, ce qui expliquerait une diminution de la phosphorylation du glucose et de la synthèse de glycogène observées.(83) La contribution des AGL au développement de la résistance à l'insuline semble d'une importance cruciale en ce qui concerne l'obésité viscérale. Le tissu adipeux viscéral n'est pas seulement caractérisé par une localisation centrale, mais aussi par une densité élevée d'adipocytes par unité de masse et par une densité élevée de récepteurs hormonaux. Il est plus innervé, reçoit un apport sanguin supérieur et est donc métaboliquement plus actif par rapport au tissu adipeux sous-cutané. Le taux de lipolyse est plus prononcé et les AGL ainsi libérés ont un accès direct à la circulation portale.(342) De plus le tissu adipeux viscéral présente une réponse diminuée aux effets antilipolytiques de l'insuline.(378)

1.3.4 Pathophysiologie

La résistance à l'action de l'insuline, observée dans l'obésité, se situe essentiellement au niveau de la signalisation post-réceptorielle de l'hormone. Elle se traduit par deux anomalies majeures: une diminution du transport de glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes, et une diminution de la synthèse du glycogène.(218) Cette réduction de la sensibilité à l'insuline est compensée par l'augmentation dans la sécrétion insulinaire.(349) Elle est due, en premier lieu, à un accroissement de la masse des cellules β pancréatiques. En effet, la masse des cellules β est déterminée par un équilibre entre les processus de neogenèse, de réplication, d'hypertrophie et d'apoptose. Au cours de l'obésité, l'augmentation de la masse des cellules β pancréatiques semble être due principalement à leur hypertrophie et leur hyperplasie.(349) En deuxième lieu, une augmentation de la sécrétion d'insuline est possible grâce à une élévation de l'activité de la glucokinase dans les cellules β . Cette enzyme joue un rôle clé dans le métabolisme du glucose dans ces cellules. Elle catalyse la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate et ainsi piège le glucose à l'intérieur de la cellule. La résistance à l'insuline est associée à une activité augmentée de cette enzyme, ce qui induit la diminution du seuil glycémique provoquant la sécrétion de l'insuline.(19) Ainsi, sans l'apparition de dysfonctionnement des cellules β , le pancréas sera en mesure de sécréter une quantité suffisante d'insuline afin de compenser la résistance à l'insuline et prévenir ainsi le développement de l'hyperglycémie.(349) Toutefois, comme nous le verrons plus loin, l'apparition de dysfonctionnement des cellules β se traduira par le développement du diabète.

1.4 Diabète

En 1992, le Conseil Canadien sur le Diabète a émis les premières lignes directrices de pratiques cliniques concernant le traitement du diabète au Canada. En 1998, le Conseil a produit des nouvelles lignes directrices relatives à la classification et aux critères diagnostiques du diabète qui tenaient compte des modifications proposées et adaptées par l'Association Américaine du Diabète (ADA). Ces changements ont par ailleurs été adoptés par l'OMS dans un rapport publié en 1999.(366) Dans le but de mieux situer le diabète, faisons un bref survol de sa définition, classification, des critères diagnostiques et des complications, tels qu'adoptés et utilisés jusqu'à ce jour par la majorité des organismes de santé.

1.4.1 Définition

Selon la définition de l'OMS, le diabète est un terme décrivant un désordre métabolique d'étiologie multiple caractérisé par une hyperglycémie chronique et un dérangement du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, causé par un déficit de la sécrétion d'insuline et/ou de l'action d'insuline.(366)

1.4.2 Classification

Les divers types de diabète sont classés en fonction de la pathogenèse. Cette classification étiologique distingue 4 types décrits dans le tableau 4.(201)

Tableau 4 : Classification étiologique du diabète**I. Diabète de type 1 :**

- Origine immunitaire
- Idiopathique

II. Diabète de type 2**III. Diabète gestationnel****IV. Autres types particuliers :**

- Défauts génétiques de la fonction des cellules β pancréatiques
- Affections du pancréas endocrine
- Infections
- Origine médicamenteuse ou chimique
- Défauts génétiques de l'action de l'insuline
- Endocrinopathies
- Formes rares de diabète d'origine immunitaire
- Autres syndromes génétiques parfois associés au diabète

(Adapté de l'Association Canadienne du Diabète, 1998)

1.4.2.1 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1, autrefois appelé le diabète insulino-dépendant, est un terme qui englobe le diabète secondaire à une destruction des cellules β pancréatique et qui a tendance à provoquer l'acidocétose. Ce diabète compte pour 5 à 10 % de tous les diabètes diagnostiqués. Le diabète de type 1 est subdivisé en deux sous-types; d'une part le diabète auto-immun et d'autre part le diabète idiopathique. Ainsi, le diabète de type 1 est le plus souvent causé par une destruction auto-immune des cellules β . L'interaction

entre les facteurs génétiques et environnementaux est à l'origine de ce processus.(201,268) Les marqueurs de la destruction auto-immune des cellules β incluent les anticorps anti-îlots (ICA), anti-insuline (IAAs), anti-acide glutamique décarboxylase (GAD), et anti-tyrosine phosphatase IA-2 et IA-2B. Lors du diagnostic d'hyperglycémie à jeun, l'un ou plusieurs de ces anticorps peuvent être dépistés chez 85-90% des individus. Le taux de destruction des cellules β est très variable; rapide chez certains individus et lent chez d'autres. La progression rapide de la maladie est souvent observée chez les enfants et les adolescents, mais elle peut survenir aussi chez les adultes. La forme impliquant une destruction progressive survient plutôt chez les adultes, et elle est appelée le diabète de type 1 lent ou "*latent auto-immune diabetes in adults*" (LADA). Une des caractéristiques majeures de diabète de type 1 est l'évolution très fréquente vers l'insulinoréquence due à une déficience absolue de l'insuline. Le diabète auto-immun apparaît surtout à l'enfance et à l'adolescence, mais il peut survenir à n'importe quel âge. Généralement, les patients atteints de cette forme de diabète ne sont pas obèses. Toutefois, la présence d'obésité n'est pas incompatible avec le diagnostic de la maladie. Certaines formes de diabète de type 1 n'ont pas d'étiologie connue; elles sont classées sous l'appellation de diabète idiopathique. Certains des patients peuvent présenter une absence d'insuline permanente et sont susceptibles à l'acidocétose. Toutefois, il y a absence des marqueurs d'auto-immunité. Seulement une minorité des patients diabétiques sont dans cette catégorie, et la majorité de ceux qui le sont est d'origine Africaine et Asiatique.(268)

1.4.2.2 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2, nommé auparavant le diabète non-insulino dépendant, recouvre lui-même 2 sous types. Le premier est une insulino-déficience prépondérante accompagnée par une résistance à l'insuline. Le deuxième est une insulino-résistance prépondérante conjuguée à une déficience relative en insuline.(268,366) En général, les individus atteints de ce type de diabète ne sont pas dépendants de l'insuline exogène. Toutefois, ils peuvent en avoir besoin pour le contrôle de la glycémie plasmatique, si les autres ressources telles que la diète et/ou les agents oraux hypoglycémisants ne donnent pas des résultats escomptés.(221) Le diabète de type 2 représente environ 90 à 95 % de tous les cas de diabètes.(201) Sa physiopathologie sera discutée plus loin.

1.4.2.3 Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel se veut comme l'apparition ou la reconnaissance de l'intolérance au glucose observée au cours de la grossesse. Ce diabète, présent dans 2 à 4% de grossesses, peut parfois avoir des conséquences néfastes aussi bien sur le bébé que sur la mère.(201)

1.4.2.4 Les autres types particuliers

La classe des autres types particuliers de diabètes secondaires est associée à une cause bien définie. Il s'agit des diabètes pancréatiques, endocriniens, des formes monogéniques de diabète ou des diabètes associés à un syndrome génétique ou provoqués par des agents chimiques. Toutefois, ces affections sont relativement peu communes.(201,268)

1.4.3 Critères diagnostiques

Le diabète peut présenter des symptômes caractéristiques tels qu'une polyurie, une polydipsie, une fatigue, une perte de poids, une vision embrouillée et dans des cas plus sévères une acidocétose et un coma hyperosmolaire. Toutefois, les symptômes peuvent être très légers ou même absents, comme c'est souvent le cas dans le diabète de type 2. D'ailleurs, l'état d'hyperglycémie peut passer inaperçu pendant une longue période de temps avant que le diagnostic ne soit posé. (268,366)

Plus précisément, le diabète est défini par des valeurs glycémiques à risque de rétinopathie.(Voir tableau 5) Ainsi, le seuil de la glycémie à jeun définissant le diabète est de 7 mmol/L ou 1.26g/L, et celui de la glycémie à la 2^e heure de l'hyperglycémie provoquée oralement (HGPO) est celui qui est supérieur ou égal à 11 mmol/L ou 2 g/L. Les deux tests, la glycémie à jeun et l'HGPO, définissent un degré semblable d'hyperglycémie et de risque de maladies microvasculaires. Deux autres catégories d'hyperglycémie sont aussi à prendre en considération; l'intolérance au glucose (IG) et la glycémie à jeun marginale.(Voir tableau 5) Ces deux catégories font référence aux états métaboliques intermédiaires entre l'homéostasie normale du glucose et le diabète, car ils représentent des valeurs glycémiques comprises entre la limite supérieure de la normale et la valeur seuil définissant le diabète.(201) Il faut préciser que ces deux états ne sont pas interchangeables et représentent des anomalies distinctes à des niveaux de la régulation du métabolisme des glucides; l'un à jeun et le deuxième à l'état post-prandial.(268,366) L'intolérance au glucose et l'hyperglycémie à jeun non diabétique ne sont pas des entités cliniques en soi, mais elles servent de marqueur de risque d'apparition de diabète de type 2 et représentent par ce biais un facteur de risque important de développer les maladies cardiovasculaires.(201)

Tableau 5 : Glycémies servant au diagnostic

Catégorie	GPJ mmol/L	GP 1h après charge de 75 g de glucose mmol/L	GP 2h après charge de 75 g de glucose mmol/L
Glycémie à jeun marginal	6.1 - 6.9	S/O	S/O
Intolérance au glucose (IG)	< 7.0	S/O	7.8 - 11.0
Diabète	≥ 7.0	S/O	≥ 11.1
Diabète gestationnel * (DG)	≥ 5.3	≥ 10.6	≥ 8.9

GPJ = glycémie plasmatique à jeun, GP = glycémie plasmatique, S/O = sans objet ou sans importance*Pour diagnostiquer un diabète gestationnel (DG), il faut deux valeurs anormales parmi les trois mesures.

(Tiré de l'Association Canadienne du Diabète, 1998)

1.4.4 Conséquences

Le diabète, quelle que soit sa forme, est une maladie qui touche tous les aspects de la vie humaine. Les conséquences pathophysiologiques du diabète sont d'ordre micro- et macro-vasculaires, et elles se traduisent à long terme par des complications dégénératives multisystémiques. Les atteintes impliquent d'importantes séquelles, des dommages, des dysfonctions et une défaillance au niveau des divers organes; reins, yeux, système nerveux, appareil circulatoire, etc. Elles sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité très élevées dans la population diabétique. L'hyperglycémie persévérante semble être le facteur primordial dans la genèse des diverses complications microvasculaires. Les atteintes macrovasculaires, quant à elles, sont multifactorielles.(201,268)

1.4.5. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 n'est pas une entité clinique distincte, mais plutôt un regroupement des divers désordres chroniques et progressifs menant au développement d'une hyperglycémie.(366) Avant de rentrer dans les détails, nous pouvons proposer un modèle simplifié pour expliquer l'apparition de l'hyperglycémie.

1.4.5.1 Les principales séquences dans le développement du diabète de type 2

Les études montrent que la résistance à l'insuline a) précède le développement du diabète; et b) est toujours présente chez les patients diabétiques, avec l'intolérance au glucose qui est un marqueur de l'apparition du diabète. Il semble donc que le défaut primaire dans le diabète de type 2 soit une résistance périphérique à l'action d'insuline.(202,72) Dans un premier temps, cette résistance à l'insuline peut s'adapter par l'activation des mécanismes compensatoires des cellules β , ce qui permet une sécrétion augmentée d'insuline. L'hyperinsulinémie maintient temporairement le glucose plasmatique à des niveaux physiologiques normaux.(261) Dans un deuxième temps, la résistance à l'insuline progresse et l'hyperinsulinémie compensatoire augmente à son tour. Cependant, l'augmentation des taux d'insuline sécrétée n'est plus suffisante à contrecarrer la résistance à l'insuline et à préserver une homéostasie glucidique normale. La glycémie plasmatique à jeun reste normale, alors que la glycémie post-prandiale est élevée. C'est ainsi que l'état de l'intolérance au glucose apparaît.(261) Dans un troisième temps, l'état de la résistance à l'insuline continue à s'aggraver. À cette étape la production basale du glucose hépatique augmente ce qui contribue à l'augmentation du glucose plasmatique. Progressivement, une désensibilisation et une décompensation des cellules β se produit causant la diminution dans la sécrétion insulinaire. Les niveaux

d'insuline toujours très élevés ne sont plus, toutefois, en mesure de maintenir une glycémie plasmatique normale.(261) Une hyperglycémie à jeun apparaît alors et les symptômes cliniques typiques du diabète se développent.

Il est crucial de comprendre que l'hyperglycémie apparaît seulement s'il y a une anomalie dans la sécrétion d'insuline. Il faut préciser que cette anomalie représente surtout l'incapacité des cellules β à s'adapter à une demande augmentée dans la sécrétion d'insuline, elle-même due à une réduction de la sensibilité tissulaire à l'insuline. Le développement du diabète de type 2 requiert donc la présence concomitante de la résistance à l'insuline et de dysfonctionnement des cellules β . Les principales étapes dans le développement du diabète sont résumées dans la figure 6.

Figure 6 : Les principales étapes menant au diabète de type 2

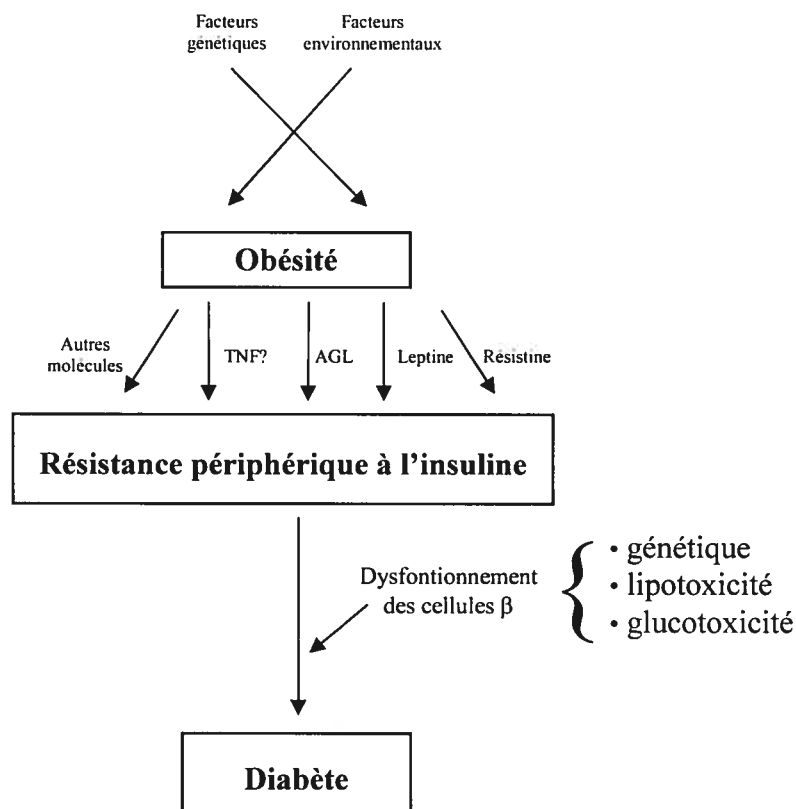


Fig. 6: L'obésité, un état caractérisé par un excès de poids corporel, résulte de l'interaction complexe des facteurs génétiques et environnementaux. Par ailleurs, l'obésité est accompagnée par des dérangements significatifs au niveau des différentes molécules (AGL; acides gras libres, leptine, résistine, TNF- α ; le facteur de nécrose tumorale α et autres), qui à leur tour promeuvent le développement de la résistance périphérique à l'insuline. Celle-ci est compensée par l'augmentation de la sécrétion d'insuline, ce qui maintient la glycémie plasmatique dans les valeurs normales. Cependant, l'apparition de dysfonctionnement des cellules β , due aux facteurs génétiques et à la glucotoxicité et lipotoxicité, induit une réduction de la sécrétion insulinaire. L'hyperglycémie s'en suit en même temps que le développement progressif des symptômes cliniques du diabète.

1.4.5.2 Les principales anomalies impliquées dans l'étiologie du diabète de type 2

Le diabète de type 2 se caractérise par trois anomalies majeures. 1) Une résistance aux diverses actions métaboliques de l'insuline. 2) Une perturbation de la sécrétion d'hormones pancréatiques. 3) Une augmentation de la production hépatique du glucose. Il est à noter que toutes ces perturbations peuvent varier en fonction de la sévérité et de la durée du diabète, de la résistance à l'insuline et de l'obésité.(119,258) Nous allons revoir brièvement la littérature scientifique portant sur ce sujet.

1.4.5.2.1 La résistance périphérique à l'insuline

La sensibilité tissulaire à l'insuline est diminuée de 35 à 40 % chez les sujets diabétiques, tel qu'observé par DeFronzo et coll.(72) Cette désensibilisation insulinique affecte principalement le tissu musculaire et dans une moindre mesure, le tissu adipeux.

- Le tissu musculaire

Le tissu musculaire constitue le site principale de la résistance à l'insuline. En effet, une diminution de l'utilisation du glucose stimulé par l'insuline peut, dans le muscle des sujets diabétiques, atteindre les 50 %.(72) Par ailleurs, de nombreux investigateurs ont constaté que la résistance à l'insuline était attribuée principalement à une diminution de la synthèse du glycogène.(60,287) Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène y compris 1) une réduction de l'activité de la glycogène synthase, l'enzyme clé dans la synthèse de glycogène; 2) une diminution de l'activité de l'hexokinase II; 3) un abaissement de la phosphorylation du glucose (~60%); et surtout 4) une altération dans le transport du glucose.(28,359,139,140,60,180,51) Malheureusement, les voies métaboliques

impliquées dans le transport et la phosphorylation du glucose, et de la synthèse du glycogène étant interreliées, les connaissances actuelles ne nous permettent pas d'identifier clairement les relations de cause à effet ni de définir leur origine exacte.

Un autre défaut métabolique est l'oxydation réduite des glucides dans le muscle squelettique des sujets diabétiques.(119,172) Cette voie métabolique est contrôlée par la pyruvate déshydrogénase (PDH), une enzyme mitochondriale. Une augmentation de 30% de son activité a été observée après l'addition de l'insuline aux myoblastes humains en cultures.(139) Par contre, chez les sujets diabétiques une diminution de l'effet de l'insuline a été démontrée sur l'activité de la PDH, ce qui peut expliquer une diminution de l'oxydation des glucides.(172)

- Tissu adipeux

Au niveau du tissu adipeux, l'action inhibitrice de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire est diminuée. Ceci résulte en une augmentation des acides gras libres circulants qui, une fois pris par les autres tissus, contribuent au développement de l'hyperglycémie. Ainsi, au niveau du foie, les AGL stimulent la gluconéogenèse. Dans le muscle squelettique, ils augmentent l'oxydation lipidique et diminuent l'utilisation du glucose.(218) Enfin, dans le pancréas, l'accumulation des triglycérides, résultant des taux plasmatiques élevés des AGL, peut induire l'apoptose des cellules β et affecter la sécrétion d'insuline.(118) Il est donc clair que la résistance à l'action antilipolytique de l'insuline dans le tissu adipeux a d'importantes répercussions sur d'autres organes.

1.4.5.2.2 La dysfonction des cellules β et α pancréatiques

Le dysfonctionnement des cellules β et α se traduit par des anomalies qualitatives et quantitatives de la sécrétion de l'insuline et du glucagon.:

- L'insuline

L'un des premiers défauts dans la fonction des cellules β , détecté déjà chez les sujets intolérants, se traduit par la diminution de la phase précoce de la sécrétion insulinaire en réponse au glucose. L'absence complète de cette phase caractérise, par ailleurs, l'état de diabète. Une deuxième phase dans la sécrétion d'insuline diminuée est, elle aussi, un des traits typiques de l'intolérance au glucose et du diabète. En outre, en 1981, Lang et coll. ont observé un défaut dans la pulsatilité sécrétoire d'insuline chez les diabétiques de type 2.(185) Les études subséquentes ont constaté la présence de cette anomalie aussi bien chez les diabétiques que chez les sujets intolérants au glucose.(247) Des recherches sont poursuivies afin de déterminer le rôle de ce phénomène dans le développement de l'hyperglycémie. Les causes exactes de ces anomalies ne sont pas encore connues. Nous pouvons envisager l'hypothèse du défaut acquis, mais aussi l'impact négatif de certains facteurs circulants, tels que le glucose et/ou les AGL.(119,27) Selon certaines observations, l'exposition chronique des cellules β à des niveaux élevés de glucose pourrait induire diverses altérations dans leur phénotype, telles qu'une dédifférentiation et une hypertrophie. L'exposition chronique des cellules β aux AGL a, de son côté, des effets délétères sur la sécrétion d'insuline. En effet, les AGL modifient, via les PPAR γ (*peroxysome proliferator activated receptors*), l'expression des gènes codant pour des enzymes intracellulaires des cellules β . Ainsi, chez les rongeurs, les AGL régulent négativement l'expression du gène codant pour l'acétyl-CoA carboxylase, l'enzyme

responsable de la synthèse du malonyl CoA, un inhibiteur de l'oxydation des acides gras. Par contre, les AGL modulent positivement l'expression du gène codant pour la carnitine palmitoyltransférase (CPT1), contrôlant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. Le résultat de ces effets est une diminution de la synthèse des métabolites stimulateurs de la sécrétion d'insuline, tels que le diacylglycérol et l'inositol-3-phosphate.(118) Cependant, l'observation que la plupart de ces perturbations peuvent être observées chez la majorité des sujets sains, reliés par un lien de parenté au premier degré à un diabétique, laisse entrevoir la possibilité que ces anomalies dans la sécrétion d'insuline représentent plutôt le défaut génétique.(113,331)

De plus, il a été souvent rapporté que le pourcentage de proinsuline plasmatique est plus élevé chez les sujets diabétiques de type 2 que chez les sujets sains.(275) Cette anomalie pourrait refléter un défaut dans la biosynthèse de l'insuline, et plus précisément un défaut de clivage de la proinsuline en insuline.(96,119) Une constatation très intéressante est le fait que ce défaut semble précéder le développement du diabète. En effet, la concentration élevée de proinsuline plasmatique a été observée chez les sujets présentant une intolérance au glucose.(126) D'ailleurs, certains investigateurs ont rapporté qu'une augmentation de proinsuline, absolue ou relative, est étroitement associée au risque de développer le diabète.(345,136,370)

- Le glucagon

Les sujets diabétiques présentent également des anomalies dans la fonction des cellules α pancréatiques. Elles se traduisent surtout par la présence d'une hyperglucagonémie relative, c'est à dire que les niveaux absolus de glucagon sont normaux, mais trop élevés pour l'hyperglycémie en place.(258) Par ailleurs, l'inhibition de la sécrétion de glucagon

en réponse au glucose est inférieure à la normale, et pourrait expliquer en partie la présence de l'hyperglucagonémie.(119,258). Le défaut de la reconnaissance du glucose, conséquent à la glucotoxicité, semble être à l'origine de ce processus.(191)

1.4.5.2.3 La production hépatique du glucose

La production basale du glucose hépatique est augmentée chez les diabétiques de type 2, et de nombreuses études ont observé une corrélation positive entre la production hépatique du glucose et le degré de l'hyperglycémie à jeun. L'augmentation de la production hépatique de glucose serait principalement due à une stimulation de la gluconéogenèse.(72) Chez les diabétiques, parmi les principaux facteurs responsables de la suractivation de cette voie métabolique, nous pouvons mentionner, la présence de l'hyperglucagonémie et des taux élevés des acides gras libres circulants.(72,119)

Il est à noter que le développement typique du diabète et de ces anomalies, que nous venons de voir sont observés chez les Indiens Pima. Par ailleurs, à l'échelle mondiale, les niveaux les plus élevés de diabète de type 2 se retrouvent dans cette population (50 % de la population âgées entre 30 et 64 ans).(261) Il n'est donc pas surprenant de constater que de nombreuses études ont porté sur les Indiens Pima dans le but d'élucider les phases successives des états prédiabétiques et diabétiques, ainsi que l'influence des composantes génétiques et environnementales. D'ailleurs beaucoup de nos connaissances sur le sujet découlent de ces travaux. Comme nous le verrons plus loin, le *Psammomys obesus*, une gerboise du désert, mime de très près l'évolution du diabète à l'image de celle observée chez les Indiens Pima. Le *Psammomys obesus* pourrait donc représenter un excellent modèle animal pour étudier l'impact des différents états

pathophysiologiques sur l'évolution du métabolisme des lipides. Un aspect majeur dans l'étiologie du diabète est le fait que cette maladie est précédée par l'apparition de l'obésité, de la résistance à l'insuline et de l'hyperinsulinémie. Connaissant l'association entre le diabète et les maladies cardiovasculaires, nous pouvons en effet nous poser la question à savoir quelle est la contribution respective des ces états prédiabétiques dans la genèse des anomalies lipidiques.

1.4.5.3 Conséquences du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est un grave problème de santé de par son association à une multitude de complications chroniques, aussi bien micro- que macro- vasculaires. L'impact des complications reliées au diabète de type 2 sur la santé des individus atteints est une preuve solide en soi quant à la nécessité d'employer des traitements efficaces afin de retarder et/ou de prévenir l'apparition de la maladie.

Les principales complications métaboliques aiguës sont l'hypoglycémie, l'acidocétose et l'état hyperglycémique-hyperosmolaire. Toutefois, ces atteintes surviennent plus souvent dans le diabète de type 1 que de type 2.(201)

1.4.5.3.1 Les atteintes microvasculaires

Les atteintes microvasculaires surviennent rarement avant cinq ans d'évolution de l'hyperglycémie. Cependant, on estime que le diabète de type 2 évolue 7 à 8 ans avant d'être dépisté. Il en découle, qu'au moment du diagnostic, près de 30 % des diabétiques de type 2 présentent une ou plusieurs des complications microvasculaires.(204) Les travaux portant sur les bénéfices du contrôle de la glycémie suggèrent que les atteintes micro-vasculaires sont liées à l'hyperglycémie soutenue.

L'étude de UKPDS33, portant sur 3867 patients diabétiques de type 2 avec un suivi de 10 ans, a bien démontré qu'une maîtrise serrée de la glycémie résulte en une diminution importante d'apparition de complications microvasculaires.(149) Les mécanismes précis sous-jacents aux dommages induits par l'hyperglycémie ne sont pas très bien compris. Les hypothèses proposées aujourd'hui suggèrent qu'une accumulation de glucose dans les tissus librement perméables au glucose, tels que la rétine, le rein et les nerfs, induit quatre voies métaboliques qui sont à l'origine des dommages observés.(37,49) Plus précisément, une élévation de la glycémie plasmatique entraîne à son tour 1) une augmentation intracellulaire de sorbitol par la voie d'aldose réductase; 2) la formation des produits terminaux de glycosylation avancés; 3) l'activation des isoformes de la protéine kinase C et 4) une stimulation de la voie d'hexosamine. Par divers mécanismes, ces changements induisent l'œdème, l'ischémie, la néovascularisation de la rétine provoquée par une hypoxie, la protéinurie, l'expansion de la matrice mesangiale, la sclérose glomérulaire du rein, et la dégénération multifocale des axones des nerfs périphériques.(37) L'importance des ces voies métaboliques a été démontrée par les études chez les animaux, chez lesquels l'inhibition spécifique de ces quatre voies a en effet, amélioré certaines des anomalies microvasculaires.(90,134,150,229,291)

Tel que nous l'avons mentionné auparavant, l'hyperglycémie affecte principalement la rétine, le rein et les nerfs, ce qui se traduit par des pathologies suivantes:

1. La rétinopathie

La rétinopathie diabétique est la cause principale de la cécité et des handicaps visuels chez les adultes de moins de 60 ans, et ce en Amérique du Nord. On distingue deux types d'atteintes; la rétinopathie de fond et la rétinopathie proliférante. La rétinopathie

de fond est caractérisée par la présence de micro-anevrisme, d'hémorragie punctiforme et d'exsudats durs causés par une perméabilité vasculaire rétinienne anormale. Elle est présente chez 50% des diabétiques de type 2 après 20 ans évolution. A ce stade, la vision est préservée. La rétinopathie proliférante, quant à elle, présente la forme la plus avancée de la maladie. Elle est caractérisée par de l'ischémie, des infarctissements rétiniens et une néovascularisation. À long terme, elle atteint 20% des patients diabétiques de type 2, et malheureusement, elle mène souvent à la cécité. Les patients diabétiques sont aussi à haut risque de développer d'autres maladies ophtalmologique telles que les cataractes.(230)

2. La néphropathie

La néphropathie diabétique est la principale cause d'insuffisance rénale terminale au Canada et dans le monde occidental. Elle est aussi à l'origine de près du tiers de tous les nouveaux cas de dialyse.(201) Chez les patients diabétiques de type 2, l'incidence d'insuffisance rénale varie de 2 à 20%.(268) L'évolution naturelle de la néphropathie diabétique comporte plusieurs stades. De façon très simplifiée, le premier est l'apparition d'une microalbuminurie (30 à 300 mg/24h), et le deuxième plus avancé se présente sous la forme de macroprotéinurie (> 300 mg d'albumine / 24h). La macroprotéinurie est invariablement accompagnée d'hypertension artérielle. Il s'ensuit l'apparition du syndrome néphrotique et une diminution du taux de filtration glomérulaire, résultant en une insuffisance rénale terminale. La microalbuminurie, qui est la première manifestation clinique décelable d'une néphropathie, survient après 5 ans d'évolution du diabète. La macroprotéinurie n'apparaît que 5 à 15 ans plus tard. Cette progression clinique est moins bien caractérisée dans le diabète de type 2, à cause de la

durée incertaine de la maladie et de la présence concomitante de néphro-angiosclérose.(268,230)

3. La neuropathie

La neuropathie est une des complications la plus commune du diabète. Elle devient détectable généralement dans les 10 ans après l'apparition de la maladie chez 50% des diabétiques de type 2. Elle peut prendre plusieurs formes telles que la polynévrite sensitivomotrice, la mononeuropathie et finalement la neuropathie autonome. La polynévrite sensitivomotrice, la forme la plus courante, est caractérisée par une diminution de la sensibilité tactile, thermique, douloureuse et vibratoire des membres inférieurs. Elle entraîne des risques accrus d'ulcération, d'infection et d'amputation. Dans la population diabétique nord-américaine, les complications aux pieds représentent environ 20% du total des hospitalisations. Aux États-Unis, les personnes diabétiques subissent entre la moitié et les deux tiers du total des amputations qui y sont pratiquées. Finalement, le taux d'amputation corrigé en fonction de l'âge est de 11 fois plus élevé chez les personnes diabétiques, un fait de plus qui souligne la gravité de cette atteinte.(201,204)

1.4.5.3.2 Les atteintes macrovasculaires

Le diabète de type 2 est un facteur de risque majeur et indépendant de diverses formes de maladies cardiovasculaires (MCV). Ces dernières représentent, d'ailleurs, la cause majeure de décès dans la population diabétique, étant responsable de 65 % de la mortalité totale.(151,178,363,348) Dans l'étude de Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) réalisée sur 347 978 sujets de sexe masculin âgés de 35 à 57 ans et avec

un suivi de 10 ans, 5163 d'entre eux étaient diagnostiqués comme diabétiques. Après l'ajustement pour l'âge, la race, le niveau socio-économique, la concentration sérique de cholestérol, la pression artérielle et le tabagisme, le risque relatif de mort coronarienne était 3.2 plus élevée chez les sujets diabétiques.(293) D'autre part, la coronaropathie se développe à un âge plus jeune dans la population diabétique.(230) Finalement, le pronostic de survie, suite au diagnostic de MCV, est moins favorable dans la population diabétique que dans la population non-diabétique.(201) Cette réalité très inquiétante n'est toutefois pas encore expliquée. Néanmoins, nous pouvons donner quelques exemples. Ainsi, l'étude de Hypertensive in Diabetes Study portant sur 3648 sujets diabétiques, révèle que 40% d'entre eux présentent une hypertension, facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires, au moment du diagnostic.(115,146) Le diabète est aussi associé, comme nous allons le voir, à des dyslipidémies athérogènes et à une dysfonction endothéliale. Mais ce qu'il faut surtout mentionner est le fait que les facteurs de risque de diabète, l'obésité et la résistance à l'insuline, sont eux-mêmes des facteurs de risque des MCV.(8,115,127) Il se peut donc que le diabète n'apporte qu'une nouvelle composante, l'hyperglycémie, à des perturbations déclenchées bien avant.

Quoi qu'il en soit, la relation entre le diabète lui-même ou l'état prédiabétique, avec diverses anomalies métaboliques impliquées dans le développement des MCV, est tellement forte qu'elle a donné naissance à un nouvel état pathologique, appelé le Syndrome métabolique que nous allons discuter au chapitre suivant.

1.5 Syndrome métabolique et athérosclérose

1.5.1 Définition du Syndrome métabolique

Un ensemble de facteurs de risques des maladies cardio-vasculaires est associé à la résistance à l'insuline. Plus inquiétant encore, il se rencontre chez le même individu. En 1988, Reaven a été le premier à définir cette relation qui a reçu le nom du Syndrome X ou du Syndrome de la résistance à l'insuline. Ce dernier regroupait auparavant la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie, l'intolérance au glucose, l'hypertension, l'hypertriglycémie, et les taux diminués de HDL.(268) Actuellement, l'appellation du Syndrome métabolique est proposée par l'OMS, car d'autres facteurs de risques se sont ajoutés à la description originale, et de plus il n'est pas établi que la résistance à l'insuline soit à l'origine de développement des chacune des ses composantes. Il est important d'indiquer qu'il n'existe pas de définition précise et acceptée internationalement du syndrome métabolique. Celle suggérée par L'OMS peut être sujette à des changements si des nouvelles observations apparaissent.(366) La définition du syndrome métabolique comporte donc, outre la présence de l'intolérance au glucose, le diabète, et/ou la résistance à l'insuline, la présence d'au moins deux autres facteurs, tels que l'hypertension, les dyslipidémies, l'obésité et la microalbuminurie. D'autres composantes du syndrome métabolique ont été décrites: désordres de coagulation, hyperuricémie, et taux de *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) élevés. Cependant, leur présence n'est pas nécessaire au moment du diagnostic.(366) (Voir figure 7)

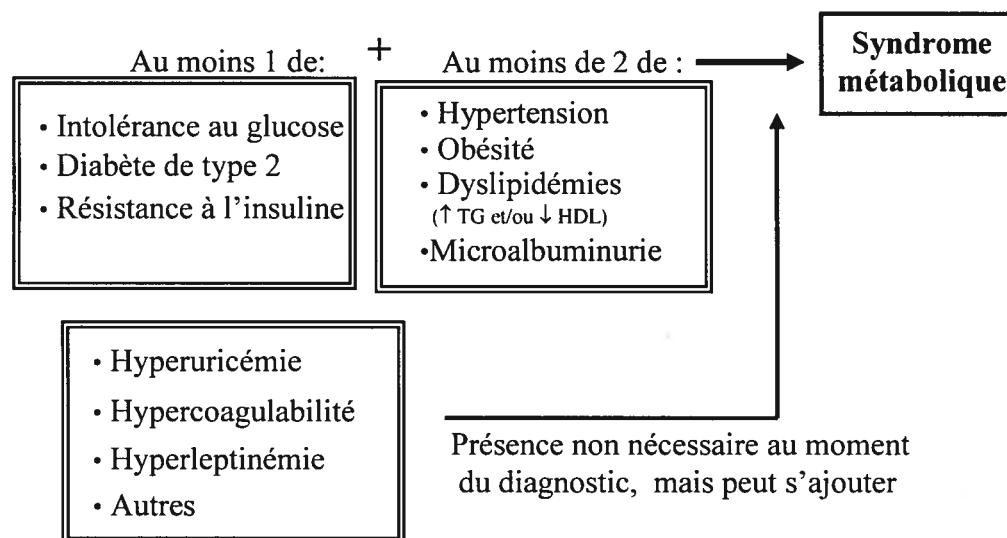
Figure 7: Le Syndrome métabolique

Fig. 7: Le syndrome métabolique se définit comme une condition exigeant la présence d'au moins une des anomalies du métabolisme du glucose et de deux facteurs de risques cardiovasculaires. D'autres anomalies cliniques peuvent être incluses (Adapté de Zimmet, 2001).

La définition des principaux paramètres est la suivante :

- La résistance à l'insuline - la sensibilité insulinémique sous le quartile le plus bas chez la population étudiée, et ce dans les conditions des clamps hyperinsulinémiques / euglycémiques.
- L'hypertension - la pression artérielle $\geq 140 / 90$ mmHg
- Les dyslipidémies - les triglycérides plasmatiques élevés ($\geq 1.7 \text{ mmol l}^{-1}$) et/ou les niveaux d'HDL diminués ($< 0.9 \text{ mmol l}^{-1}$ pour les hommes et $< 1.0 \text{ mmol l}^{-1}$ pour les femmes)
- L'obésité - l'IMC élevé ($> 30 \text{ kg m}^{-2}$) et/ou l'obésité abdominale définie par le rapport taille/hanche (> 0.9 pour les hommes et > 0.85 pour les femmes)

- La microalbuminurie - le taux d'excrétion urinaire $\geq 20 \mu\text{g min}^{-1}$ ou le ratio albumine:créatinine $\geq 30 \text{ mg g}^{-1}$.

Rappelons que, le diagnostic du Syndrome métabolique sert à identifier les individus à haut risque de maladies cardiovasculaires. Il est important de préciser que chacune des composantes augmente ce risque, mais leur effet synergique est encore plus puissant.(43)

La prévalence et les risques de maladies cardiovasculaires associés au Syndrome métabolique ont été investigués par Isomaa et coll.(151) Dans leur étude, la mortalité cardiovasculaire a été estimée chez 3606 sujets avec un suivi moyen de 6.9 ans. Chez les femmes et les hommes respectivement, le Syndrome métabolique a été observé chez 10 et 15 % des sujets avec une tolérance normale au glucose, chez 42 et 64 % des sujets avec l'IG et chez 78 et 84 % des sujets avec le diabète de type 2. De plus, le risque de maladies coronariennes et d'accidents cardio-vasculaires était 3 fois plus élevé chez des individus présentant ce syndrome, et la mortalité cardiovasculaire était augmentée significativement chez des sujets atteints de syndrome métabolique par rapport aux sujets qui ne l'étaient pas (12% vs 2.2 %). Cette étude confirme l'utilité de la définition de Syndrome Métabolique dans l'identification des sujets à risque élevé de morbidité et de mortalité cardiovasculaire.(151)

La résistance à l'insuline, associée à l'obésité, est une étape observée dans l'histoire naturelle du diabète de type 2. Comme nous l'avons souligné, elle semble constituer un état prédiabétique qui peut être présent pendant plusieurs années avant que

la maladie comme telle ne se développe et que le diagnostic ne soit posé. L'importance de cette réalité réside dans le fait que l'obésité, la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie semblent à elles seules, être à l'origine du développement de certaines des anomalies mentionnées précédemment.(261) De nombreux individus, en absence d'hyperglycémie, ignorent ou sous-estiment les risques qu'ils encourent à développer des maladies cardiovasculaires. Connaissant la mortalité très élevée reliée au Syndrome métabolique, il est crucial d'investiguer l'apport de chacune de ses composantes principales dans la genèse des différents facteurs de risque. Plus précisément des questions se posent sur le rôle exact joué par l'obésité, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie dans l'apparition de certaines des anomalies. Par exemple, est-ce que ces trois identités affectent-elles les mêmes voies métaboliques et les mêmes tissus ? Quelles sont les étapes initiales ? Le diabète apporte-il des nouveaux éléments pathologiques ou reflète-il uniquement la progression séquentielle des anomalies engendrées plutôt ? Parmi les dérangements observés on compte évidemment les dyslipidémies dont, malheureusement, les mécanismes sous-jacents sont encore très mal connus. Pourtant, les désordres lipidiques sont au cœur de MCV, surtout par leur rôle dans le développement de l'athérosclérose.

1.5.2 Athérosclérose

La majorité des maladies cardiovasculaires ont l'athérosclérose comme origine commune. Elle est la cause primaire des infarctus myocardiques et des accidents cérébraux vasculaires. Dans les pays industrialisés, elle reste une des pathologies les plus meurtrières. En effet, malgré les progrès considérables dans la compréhension de sa physiopathologie et dans sa prise en charge clinique, l'événement athéromateux est la

cause sous-jacente de 50% des tous les décès. Malheureusement, comme nous l'avons déjà mentionné, la présence de l'état de la résistance à l'insuline et/ou de diabète de type 2 alourdit ce tableau.

L'athérosclérose est plus exactement une maladie progressive qui se caractérise par des processus inflammatoires en association avec l'accumulation des lipides et des éléments fibreux dans la paroi de gros vaisseaux. La rupture ou l'érosion d'une plaque athéromateuse et la formation d'un thrombus obstruant la lumière vasculaire se traduisent cliniquement par le syndrome coronarien aigu.(207)

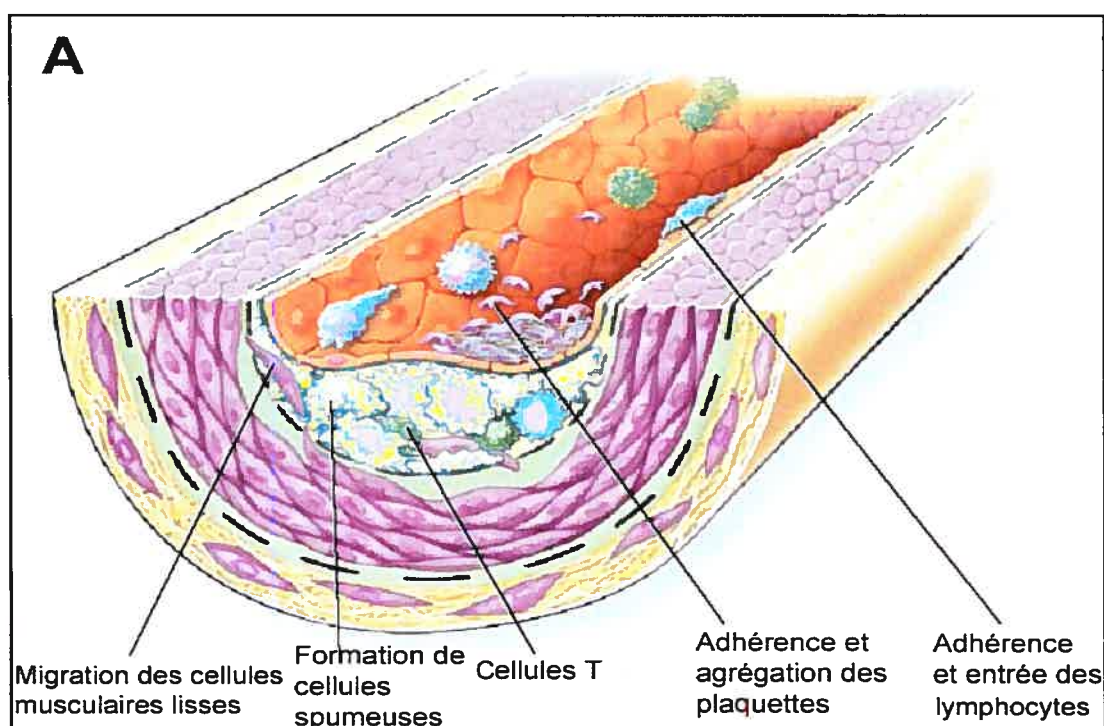
1.5.2.1 Le développement de l'athérosclérose

Les phases successives de la formation des lésions précoces d'athérosclérose et de leur progression vers des lésions avancées sont très complexes et impliquent divers phénomènes. Nous présenterons les principales d'entre elles et les illustrerons dans les figures 8A-C.

La phase initiale dans le développement de l'athérosclérose correspond à une dysfonction endothéliale. Les causes fondamentales à l'origine de cette perturbation sont encore très mal connues, toutefois, nous pouvons mentionner certains des facteurs suggérés tels que la perte du flux laminaire, les dyslipoprotéïnémies, l'hypertension, le tabagisme. Dans les stades précoces, les altérations endothéliales se traduisent par une augmentation de la perméabilité vasculaire aux lipoprotéines et de l'expression des molécules d'adhésion, attirant les monocytes et les lymphocytes et facilitant leur migration dans l'espace sous-endothélial. Les monocytes ainsi recrutés, s'activent et se différencient en macrophages, qui se gorgent alors de composantes lipidiques, surtout le cholestérol, pour former des cellules spumeuses. L'accumulation dans le sous-

endothélium des cellules spumeuses et des lymphocytes T, constitue les premières manifestations histologiques de l'athérosclérose, appelées les stries lipidiques. Dans les prochaines étapes, les cytokines et les facteurs de croissances, sécrétés par les cellules inflammatoires, recrutent et stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses. L'amplification du processus inflammatoire, se traduit aussi par l'adhésion subséquente des plaquettes et d'autres lymphocytes. (Voir figure 8-A)

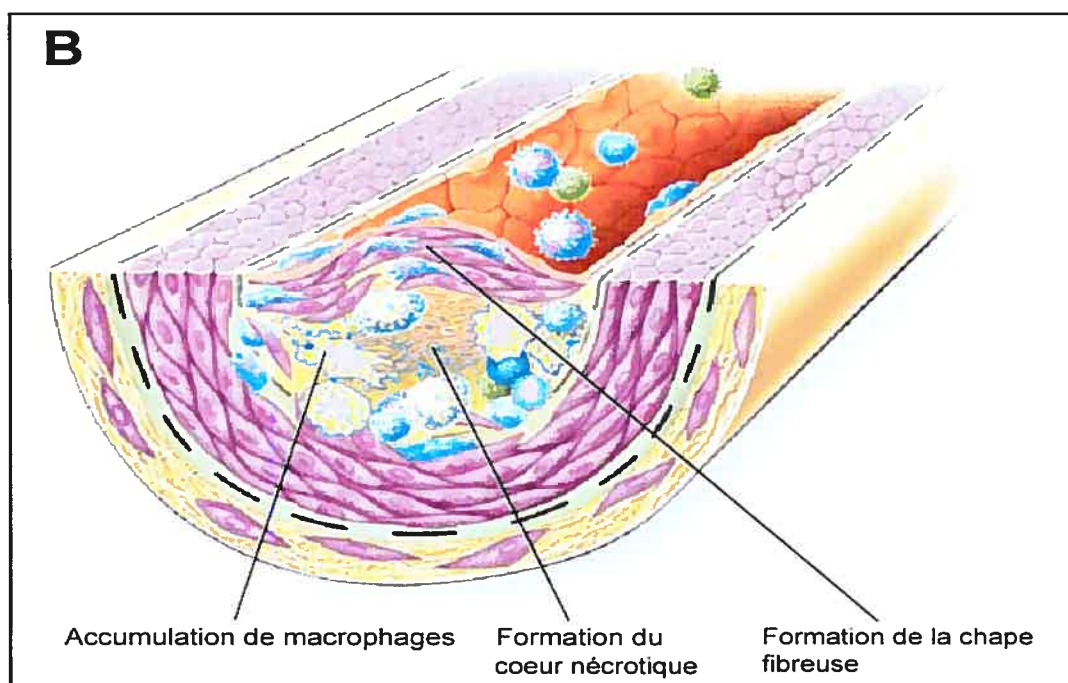
Figure 8: Le développement de l'athérosclérose.



(Adapté de Ross, 1999)

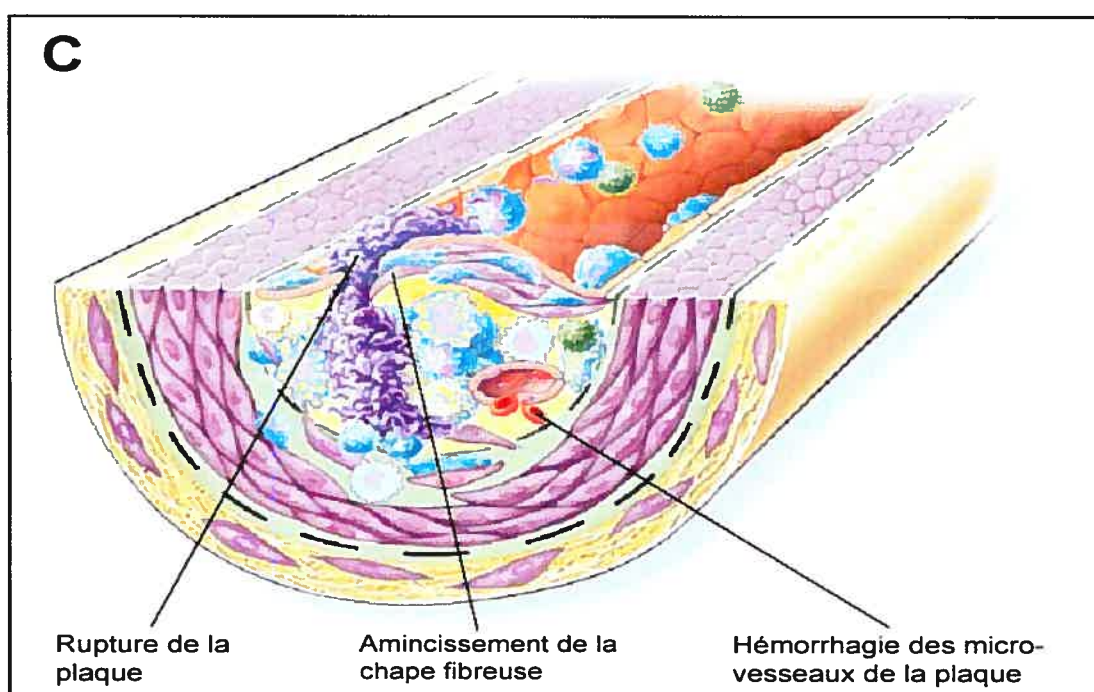
Les stries lipidiques représentent des lésions réversibles de l'athérosclérose et n'ont pas de conséquences cliniques. Toutefois, elles peuvent évoluer vers des lésions plus avancées, appelées des «lésions fibreuses». Elles se caractérisent par l'accumulation de

débris cellulaires, de lipides extracellulaires, surtout du cholestérol et de ses esters, recouverts en général d'une «chape fibreuse» constituée par les cellules musculaires lisses et d'une matrice protéique extracellulaire secrétées par ces cellules. La présence de nombreux macrophages (spumeux ou non) et de quelques cellules T est aussi observée. Le rôle de la chape fibreuse est très important, car en empêchant le contact entre le cœur nécrotique riche en lipides et la circulation sanguine, elle stabilise la plaque d'athérosclérose. L'influence respective des cellules inflammatoires qui tendent à déstabiliser la plaque et des cellules musculaires lisses qui lui confèrent la stabilité par leur rôle de synthèse des éléments fibreux, détermine la vulnérabilité de la plaque d'athérome et le risque de sa rupture. (Voir figure 8-B)



Finalement, les phénomènes de calcification, d'ulcération, d'hémorragie, et des hématomes peuvent compliquer d'avantage la plaque d'athérome. Les lésions avancées

continuent à croître en volume et en taille et progressent vers l'adventice et la lumière artérielle. Les lésions peuvent grossir suffisamment au point de créer des ischémies. Cependant, les complications cliniques majeures, telles que les infarctus myocardiques et cérébraux, sont causées par des occlusions aiguës provoquées par la formation d'un thrombus ou d'un caillot de sang. Ces thromboses sont généralement déclenchées par la rupture ou l'érosion d'une plaque. (Voir figure 8-C)



En effet, la rupture et/ou l'érosion exposent les substrats thrombogènes de la plaque aux plaquettes circulantes, ce qui induit l'adhésion, l'activation et l'agrégation de ces dernières. En même temps, l'association entre le facteur tissulaire du centre nécrotique et le facteur VIIa en circulation sanguine induit l'activation de la cascade enzymatique responsable de la génération de la thrombine et de la formation de la fibrine. Le facteur tissulaire est, plus exactement, une protéine clé initiant la coagulation sanguine et il est

secrété par les macrophages et les cellules musculaires lisses. L'évolution de ce thrombus fibrino-plaquettaire étant un processus dynamique, l'influence entre les processus prothrombotiques et antithrombotiques détermine son potentiel occlusif.(207,272,350)

1.5.3 Syndrome métabolique et athérosclérose

L'étiologie de l'athérosclérose est très complexe impliquant l'interaction entre les composantes génétiques et environnementales.(207) Parmi les principaux facteurs susceptibles de favoriser son développement précoce dans le diabète, la dysfonction endothéliale et les anomalies lipoprotéiniques tiennent une place prépondérante.

1.5.3.1 La dysfonction endothéliale

De nombreuses études cliniques indiquent que la dysfonction endothéliale est un aspect intégral des perturbations retrouvées chez les sujets diabétiques de type 2.(235,360) Comme nous l'avons déjà mentionné, la dysfonction endothéliale est un élément clé dans la genèse des lésions athérosclérotiques. Par ailleurs, il faut rappeler qu'elle se retrouve chez les individus diabétiques, qui présentent d'autres complications telles que l'hypertension et des atteintes micro- et macro-angiopathiques. Cette observation suggère une forte association entre les altérations de la réactivité vasculaire et les diverses atteintes cardiovasculaires, même si les mécanismes et les relations de cause à effet sont toujours à l'étude.(236) D'autre part, le diabète est caractérisé par l'état de la résistance à l'insuline qui, de plus en plus, est considéré comme ayant le potentiel d'être à l'origine de certaines anomalies au niveau de la réactivité vasculaire. Cet aspect mérite donc que nous nous y arrêtions.

Les artères sont constituées de trois structures qui, de l'extérieur vers l'intérieur, sont : l'adventice, la média et l'intima. L'adventice, comprend principalement le tissu conjonctif. La média, quant à elle, est formée essentiellement de cellules musculaires lisses. L'intima, la tunique interne, est composée de cellules endothéliales disposées en une monocouche continue. L'endothélium ne forme pas seulement une barrière entre le sang et la paroi artérielle, mais il participe activement dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire.(207) En effet, il joue un rôle critique dans la régulation du flux sanguin en sécrétant des substances vasodilatatrices telles que le monoxyde d'azote (NO) et les substances vasoconstrictrices (endothéline-1, angiotensine II et tromboxane A2).(333) De plus, il synthétise des molécules qui interviennent dans les processus de la thrombose, de l'inflammation et du remodelage vasculaire.(86) Parmi les hormones qui influencent la fonction endothéliale, on retrouve l'insuline qui a reçu beaucoup d'attention. Plus précisément, cette hormone stimule la vasodilatation en augmentant la biodisponibilité de NO, molécule synthétisée par l'endothélium. Le NO est un puissant médiateur de la relaxation musculaire. Par son action activatrice sur la production de la guanosine monophosphate cyclique, il inhibe la contraction Ca^{2+} -dépendante dans les cellules musculaires lisses.(15) Par ailleurs, de nombreux travaux *in vitro* ont démontré que l'insuline inhibe directement la contraction des cellules musculaires lisses.(4,156,182) Parmi les effets observés de l'insuline on retrouve 1) une hyperpolarization de la membrane cellulaire; 2) une diminution des courants cellulaires calciques; 3) une stimulation de l'activité de Ca^{2+} - ATPase; 4) une stimulation de l'efflux de calcium et 5) une réduction de l'influx de calcium par les canaux calciques voltage - dépendants et liés à un récepteur.(4,156,182,276,294,319,373)

La dysfonction endothéliale, telle qu'observée chez les diabétiques, se traduit principalement par une diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante, impliquant une diminution de la biodisponibilité de NO.(235,360) Cependant, une hyper-réactivité des cellules musculaires lisses des sujets diabétiques a aussi été rapportée. Elle se présente par une augmentation de la contractilité à des agents comme la norépinéphrine et la phényléphrine.(102) Par ailleurs, diverses études ont constaté que la dysfonction endothéliale est déjà présente à l'état d'obésité et de résistance à l'insuline.(38,295) Compte tenu des effets vasoactifs de l'insuline que nous venons de voir, il est probable que l'état de résistance à l'insuline soit impliqué dans ces perturbations de la réactivité vasculaire. Cependant, les données actuelles sur ce sujet sont insuffisantes et beaucoup de questions restent sans réponses. En effet, la relation entre la résistance à l'insuline et la dysfonction endothéliale n'a pas été retrouvée par tous les auteurs.(295,246,327) Ceci pourrait être dû entre autre à la présence concomitante de l'hypertension chez les sujets étudiés. Par ailleurs des données manquent quant à la contribution individuelle des autres paramètres tels que l'hyperglycémie et les dyslipidémies et leur interrelation. En effet, chez les sujets sains, une hyperglycémie aiguë altère la vasodilatation endothélium - dépendante, suggérant un rôle direct de l'hyperglycémie.(361) Cependant, l'équipe de Baron a constaté la même amplitude des altérations chez les sujets résistants à l'insuline en comparaison aux sujets diabétiques.(15) De plus, si les observations de Baron et coll. reflètent la réalité, nous ne savons pas si les perturbations au niveau de la réactivité vasculaire, chez les résistants à l'insuline et les diabétiques, affectent les mêmes voies impliquées dans la contractilité et la relaxation. Par ailleurs, peu d'études se sont penchées sur l'association entre les dyslipidémies et la réactivité vasculaire. Pourtant, l'hypercholestérolémie a été associée

à une altération de la vasodilatation endothélium - dépendante dans les artères des porcs.(52) D'autre part, chez les humains l'hypertriglycémie, en absence d'hypercholestérolémie, a causé la diminution de la vasodilatation endothélium - dépendante.(198)

Les mécanismes de la dysfonction endothéliale restent encore peu connus même si beaucoup de progrès ont été effectués ces dernières années. Étant donné que les études cliniques présentent de limitations dans l'investigation des processus fondamentaux impliqués, beaucoup de chercheurs se sont tournés vers les modèles expérimentaux de diabète. La majorité d'entre eux a été, toutefois, réalisée chez les animaux dont le diabète a été induit chimiquement.

1.5.3.2 La dyslipidémie athérogénique

La dyslipidémie athérogénique est caractérisée par l'augmentation plasmatique des VLDL (very low density lipoprotein), la présence des petites et denses particules des LDL (low density lipoprotein) et la diminution du HDL-cholestérol (high density lipoprotein). Cette triade lipidique est observée souvent chez les patients avec l'athérosclérose prématurée et semble constituer un phénotype athérogénique, et ce indépendamment des concentrations élevées des LDL-cholestérol.(122)

- Les LDL

Les concentrations élevées de LDL-cholestérol sont indéniablement un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires. De plus, la réduction des concentrations élevées des LDL chez les patients avec ou sans risques de maladies cardiovasculaires protège

contre les accidents cérébraux vasculaires.(148) L'implication directe des LDL dans la genèse et l'évolution des lésions athérosclérotiques est à la base de leur rôle proathérogène. L'une des premières étapes de la formation de la plaque d'athérome correspond à l'infiltration et l'accumulation des LDL dans le sous-endothélium. Les LDL ainsi retenues sont susceptibles, au contact des cellules endothéliales, de subir diverses modifications biologiques, l'oxydation en étant la plus importante.(207) Les LDL légèrement oxydées stimulent les processus d'inflammation de la paroi artérielle en déclenchant la production par les cellules endothéliales des molécules pro-inflammatoires qui recrutent des monocytes et des lymphocytes T. Par ailleurs, les LDL oxydées sont elles-même des agents chemotactiques pour ces cellules inflammatoires. Cette entrée des monocytes et des lymphocytes dans la paroi artérielle contribue à l'oxydation subséquente des LDL. Les LDL fortement oxydées (ou modifiées) sont préférentiellement reconnues par les récepteurs scavengers des macrophages et sont internalisées massivement et de façon non contrôlée par ces derniers. Cette captation induit l'accumulation du cholestérol intracellulaire et la formation des cellules spumeuses.(207) Les LDL oxydées sont aussi impliquées dans l'apoptose des macrophages et des cellules endothéliales et musculaires lisses, un processus engagé dans la progression de l'athérosclérose.(24,93,245) De plus, elles antagonisent les effets vasodilatateurs de l'endothélium.(288) Parmi les multiples effets cytotoxiques des LDL oxydées, on retrouve aussi la stimulation de l'expression du facteur tissulaire et l'activation subséquente du système coagulant.(59,340)

Plusieurs études suggèrent que la taille des LDL est aussi un critère très important dans l'évaluation des risques des maladies cardiovasculaires. Plus spécifiquement, les LDL

petites et denses seraient même un facteur de risque indépendant des autres paramètres lipidiques.(183,184) Les mécanismes de cette association ne sont pas encore très bien élucidés. À l'heure actuelle, on pense que les petites et denses particules des LDL présentent une susceptibilité augmentée à l'oxydation.(70,71,74) Ces particules possèderaient aussi une affinité diminuée pour les récepteurs hépatiques.(234)

- Les HDL

Les études cliniques et épidémiologiques ont démontré que la concentration plasmatique de HDL-cholestérol est inversement corrélée avec les risques des maladies cardiovasculaires.(8) Cette association est souvent attribuée au rôle principal des HDL qui est de médier le retour du cholestérol tissulaire excédentaire au foie, et prévenir ainsi son accumulation dans les artères. Cependant, diverses observations indiquent que les HDL exerceraient aussi leurs actions anti-athérogènes par d'autres mécanismes. Ainsi, les HDL inhibent l'oxydation des LDL, l'événement majeur dans l'initiation et le développement de l'athérosclérose. De plus, elles exercent des effets mitogéniques sur les cellules musculaires lisses. Cette action est très importante, car la survie des ces cellules est cruciale à la stabilité de la plaque d'athérome.(237) Elles stimulent aussi la prolifération des cellules endothéliales et en même temps, elles diminuent la mort de ces cellules induite par les LDL oxydées.(238,305) Les HDL jouent également un rôle dans la préservation de l'intégrité endothéliale par d'autres mécanismes en inhibant l'adhésion des plaquettes et des leucocytes à l'endothélium et leur activation subséquente. Finalement, les HDL agissent comme des agents anti-coagulants et pro-fibrinolytiques, contribuant ainsi à prévenir le phénomène de thrombose. Cette liste

d'actions anti-athérogènes des HDL n'est pas complète, mais elle sert à souligner l'importance de ces particules dans la prévention du syndrome coronarien aigu, et ce à différentes étapes.(237)

- Les VLDL

Après avoir fait l'objet d'une controverse, l'hypertriglycémie est aujourd'hui elle aussi, considérée comme un facteur de risque important de développement de maladies cardiovasculaires.(11) Les VLDL, transporteurs majeurs des TG, jouent un rôle indirect dans l'athérosclérose, tout d'abord en étant les précurseurs métaboliques des LDL. Cependant, diverses observations suggèrent que les VLDL et les particules résiduelles de VLDL pourraient exercer des actions pro-athérogènes de façon plus directe. Les VLDL augmenteraient les concentrations de PAI-1 dans les cellules endothéliales, contribuant ainsi à des altérations de fibrinolyse.(91,299) Les VLDL, semblent contribuer également à l'état d'hypercoagulabilité en induisant l'expression du facteur tissulaire.(165) De plus, les VLDL induisent dans les cellules endothéliales l'expression du facteur de transcription NF- κ B et l'activation des certaines molécules d'adhésion, qui tous contribuent à l'inflammation et au recrutement des monocytes et des cellules T dans l'endothélium vasculaire.(77)

- La dyslipidémie diabétique

Plusieurs études ont relevé la présence des anomalies caractérisant la dyslipidémie athérogénique chez les sujets diabétiques.(328,128,178) Dans celles de Framingham, la

prévalence de l'hypertriglycéridémie chez les sujets diabétiques par rapport aux sujets témoins était de 18 % et 8.5% respectivement, et pour ce qui est des taux diminués des HDL-cholestérol, la prévalence était de 23 % versus 10.5%.(362) Sur le gel gradient d'électrophorèse, la présence des petites et denses particules de LDL a aussi été constatée chez les sujets diabétiques.(125). Finalement, les patients diabétiques peuvent aussi présenter des taux élevés de cholestérol.(298) À noter que, ces altérations lipidiques ont été observées dans les états prédiabétiques.(124,142,227) Cette observation suggère que la dyslipidémie diabétique n'est peut pas être imputée à l'hyperglycémie seule et, que probablement, l'état prédiabétique est déjà très athérogène. Toutefois, ces suppositions demandent à être vérifiées. De même, les facteurs impliqués, les mécanismes sous-jacents, et le temps d'action restent à découvrir. Les informations concernant la prévalence des dyslipidémies dues au diabète seul sont aussi incomplètes. En effet, certaines dyslipoprotéinémies peuvent être causées par des désordres héréditaires. Par exemple, la présence de phénotype E2 de l'apoprotéine E, donne naissance à une hypertriglycéridémie et à une hypercholestérolémie.(65) Le profil lipidique peut donc ressembler de très près à celui retrouvé chez les sujets diabétiques. Les études épidémiologiques évaluant les désordres lipidiques chez les diabétiques n'ont pas, malheureusement, différencié les dyslipidémies primaires des dyslipidémies secondaires à la présence de la maladie. Nos connaissances sur l'impact réel du diabète et des ses composantes sur le métabolisme qualitatif et quantitatif des lipides et des lipoprotéines demeurent bien limitées. Pourtant, comme nous l'avons vu, les dyslipidémies diabétiques sont athérogéniques. D'ailleurs, l'étude Uusitupa et coll. portant sur 277 sujets avec un suivi de 10 ans, a observé que la présence de dyslipidémies diabétiques augmente significativement les risques de la mortalité

cardiovasculaire.(328) La compréhension de leur origine est donc cruciale dans la prévention et le traitement pharmacologique des maladies cardiovasculaires. Avant de s'attaquer aux connaissances actuelles sur la pathophysiologie des dyslipidémies diabétiques, nous présenterons la physiologie normale des lipides et des lipoprotéines.

1.6 Métabolisme des lipides et des lipoprotéines

La connaissance du métabolisme général des lipides et des lipoprotéines est importante pour bien comprendre les mécanismes sous-jacents des dyslipidémies retrouvées dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète.

1.6.1 Lipides

La diète nord-américaine est constituée de 30 à 40% des lipides, ce qui correspond à une consommation journalière de 60-120 g des lipides. Plus de 95 % de ces lipides sont représentés par les triglycérides. Les phospholipides et le cholestérol n'en constituent que 5 % .(271)

1.6.1.1 Les acides gras (AG)

Les acides gras sont des composés organiques constitués des chaînes hydrocarbonées de différente longueur contenant toujours un nombre pair d'atomes de carbone (C) et un groupement carboxyle en bout de chaîne. Selon la longueur de la chaîne on distingue les AG à chaîne courte (4 -6 C), à chaîne moyenne (8-12 C), à chaîne longue (14-18 C) ou à chaîne très longue (20 C et plus). Les AG remplissent des nombreuses fonctions vitales, ils jouent aussi bien un rôle énergétique que structural

et fonctionnel. Finalement, les AG sont des constituants de différents groupes de lipides, tels que les glycérides, les phospholipides et les stérols. (206)

1.6.1.2 Les glycérides

Les glycérides sont des composés formés par une molécule du glycérol estérifié par un (monoglycérides), deux (diglycérides) ou trois (triglycérides) acides gras. Les triglycérides (TG) représentent 85 % des glycérides. Les AG des triglycérides peuvent être différents ou similaires. Les TG jouent un rôle énergétique important pour l'organisme (substrat oxydatif immédiat et réserves énergétiques sous forme des TG entreposés dans les adipocytes). Il est à souligner que les TG sont des molécules très hydrophobes.(206)

1.6.1.3 Les phospholipides (PL)

Les phospholipides sont constitués par un polyalcool estérifié par un ou plusieurs acides gras ou l'acide phosphorique et une base azotée. La phosphatidylcholine (PC) représente le principal phospholipide. Elle est constituée d'un glycérol estérifié par l'acide phosphorique, la choline et deux acides gras. Les phospholipides sont des molécules amphipatiques et des constituants fondamentaux des membranes plasmiques et d'organites cellulaires. De plus, ils jouent un rôle d'intermédiaire dans le transport et l'utilisation des acides gras dans les tissus. Les phospholipides d'origine biliaire ont une fonction essentielle dans le transport du cholestérol hépatique et des acides biliaires dans la bile, et dans l'absorption des graisses intestinales. Enfin, les phospholipides constituent pour l'organisme un substrat énergétique au même titre que les triglycérides.(206)

1.6.1.4 Le cholestérol (CH)

Le cholestérol est le principal stérol dont le squelette de base est représenté par quatre cycles de carbone liés entre eux et formant une structure cyclopentanoperhydrophénanthrène. Le cholestérol peut se présenter sous une forme libre (CL) ou sous une forme estérifiée (CE). Dans ce dernier cas, l'estérification par un acide gras se fait au niveau du groupe hydroxyle en position C-3 du cholestérol. Le cholestérol libre est une molécule relativement amphipatique, tandis que sous sa forme estérifiée, il devient très hydrophobe. (206)

Le cholestérol est le précurseur des hormones stéroïdiennes telles que les hormones sexuelles (œstrogène, testostérone) et les hormones surrénaliennes (progestérone). Le cholestérol est aussi le précurseur des acides biliaires dont l'action est indispensable à l'absorption des lipides. De plus, le cholestérol est un constituant essentiel des membranes cellulaires, et il participe à la composition et la structure des lipoprotéines. A l'opposé des triglycérides et des phospholipides, le cholestérol ne participe pas aux fonctions énergétiques de l'organisme. Enfin, le cholestérol a trois origines différentes: l'alimentation, la synthèse endogène et la recirculation à partir du cycle entéro-hépatique.(206)

1.6.2 Lipoprotéines

Les lipides sont véhiculés dans la circulation systémique dans les particules appelées les lipoprotéines. Ces dernières sont des complexes macromoléculaires constitués d'un noyau des lipides hydrophobes (TG, CE) entouré d'une monocouche de molécules amphipatiques (PL, CL) et des apoprotéines. Les lipoprotéines sont par ailleurs une population hétérogène en relation avec la proportion des différentes

composantes lipidiques, la composition en apoprotéines, la taille, la densité et la mobilité électrophorétique. Cette variabilité témoigne des origines, fonctions et métabolisme très spécifiques à chaque lipoprotéine.(206)

Les apoprotéines ou apolipoprotéines (apos) sont des régulateurs critiques du métabolisme des lipoprotéines. Elles jouent non seulement des rôles structuraux, mais elles accomplissent aussi des fonctions très importantes dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines. Finalement, elles possèdent des nombreuses propriétés biologiques. Elles servent, en effet, de co-facteurs pour certaines enzymes et des ligands pour des récepteurs, impliqués dans le catabolisme des lipoprotéines.(116)

Les classes majeures des lipoprotéines sont : les chylomicrons, les VLDL (*very low density lipoproteins*), les IDL (*intermediary density lipoproteins*), les LDL (*low density lipoproteins*) et les HDL₂ et HDL₃ (*high density lipoproteins*). Certaines de leurs caractéristiques majeures sont présentées dans le tableau 6:

Tableau 6 : Caractéristiques des lipoprotéines								
Lipoprotéines	Composition (% masse)					Apoprotéines principales	Densité	Taille (nm)
	P	PL	CL	CE	TG			
Chylomicrons	2	5	1	2	90	B48, C, E	<0.95	100-1000
VLDL	10	16	7	13	54	B100, C, E	0.95-1.006	30-70
IDL	17	20	9	34	20	B100, C, E	1.006-1.019	25
LDL	23	21	11	41	4	B100	1.019-1.063	20
HDL ₂	42	35	5	13	5	A-I, A-II	1.063-1.125	10
HDL ₃	72	20	2	5	1	A-I	1.125-1.21	8
P: protéines, PL: phospholipides, CL: cholestérol libre, CE: cholestérol estérifié, TG: triglycérides.								

(Adapté de Devulder, 1991)

1.6.3 Absorption des lipides

Les lipides sont des molécules aux propriétés physico-chimiques très particulières. Elles sont essentiellement hydrophobes. Elles doivent donc passer par diverses transformations avant de pouvoir être absorbées et assemblées dans les lipoprotéines pour être transportées dans la circulation sanguine. Une coordination élaborée est requise afin d'assurer l'efficacité des événements relatifs à l'absorption.(271)

1.6.3.1 La digestion des lipides

La digestion des lipides nécessite deux étapes importantes: une hydrolyse enzymatique suivie par la solubilisation micellaire des produits lipolytiques.

1. L'émulsification et l'hydrolyse chimique gastrique

La digestion des lipides commence par la mastication et l'humidification avec la salive. Le fractionnement mécanique de l'émulsion lipidique se poursuit avec le péristaltisme gastrique.(271) La prochaine étape de la digestion des lipides est l'hydrolyse des TG dans l'estomac. L'enzyme responsable de ce processus est la lipase gastrique qui est appelée à fonctionner à un pH acide. Elle hydrolyse plus rapidement les TG à chaîne moyenne que les TG à chaîne longue. Les produits principaux de son hydrolyse sont les DG et les AG.(254) À ce stade l'émulsion lipidique formée se présente sous forme des grosses particules lipidiques stabilisées par les produits de la lipase gastrique, tels que les AG, les 2-MG et les phospholipides diététiques.(271)

La contribution de la lipase gastrique dans la digestion des lipides est très importante. Premièrement, l'hydrolyse des TG par cette enzyme joue un rôle crucial dans

l'absorption des lipides diététiques quand la sécrétion de la lipase pancréatique fait défaut, comme c'est le cas chez les prématurés et les enfants atteints de la fibrose kystique. Deuxièmement, l'émulsification gastrique des lipides est un prérequis indispensable pour une hydrolyse efficace par la lipase pancréatique.(254)

2. L'hydrolyse pancréatique et la solubilisation micellaire

Le contact des AG, le produit d'hydrolyse gastrique, avec la paroi de duodénum déclenche la sécrétion de la cholécystokinine par les entérocytes.(271) La cholécystokinine stimule la contraction de la vésicule biliaire laquelle déverse la bile dans le duodénum. Les sels biliaires jouent à ce stade un rôle primordial. Grâce à leur pouvoir émulsifiant, ils dispersent les lipides et réduisent par le fait même la taille des gouttelettes lipidiques. Ces dernières passent de 2-5 à 0,5 μm . Cette réduction stabilise les particules lipidiques et augmente l'interface l'huile-eau, c'est à dire la surface d'exposition aux effets lipolytiques des enzymes. La cholécystokinine active aussi la sécrétion pancréatique du suc digestif riche en diverses enzymes nécessaires à l'hydrolyse des lipides.(271)

L'entrée du chyme gastrique dans le petit intestin stimule aussi la sécrétion de la sécrétine, par les cellules duodénales, qui induit à son tour la sécrétion d'un suc riche en bicarbonate par les ductules pancréatiques et biliaires. Le bicarbonate neutralise le pH acide du chyme gastrique et maintient un pH basique, favorable à l'action des enzymes pancréatiques.(254,271)

Les molécules des TG sont hydrolysées par la lipase pancréatique à la position 1 et 2. Ce processus conduit à la formation des 2-monoglycérides (2-MG) et des AG. L'efficacité de la lipase pancréatique nécessite la présence de son co-facteur, la colipase. En effet, les

gouttelettes lipidiques sont couvertes par les acides biliaires empêchant ainsi l'adhérence de la lipase pancréatique à l'interface eau-huile. La colipase est sécrétée par le pancréas dans le suc pancréatique sous une forme inactive en tant que molécule de procolipase. Elle est par la suite activée par la trypsine, une enzyme protéolytique sécrétée elle aussi par le pancréas. La colipase se lie à la surface des gouttelettes lipidiques et permet à la molécule de la lipase d'avoir accès aux TG. La lipase pancréatique se lie avec la colipase à un ratio molaire de 1 : 1.

Les phospholipides sont hydrolysés par la phospholipase pancréatique A₂ à la position 2. Les produits d'hydrolyse d'une molécule de phospholipide sont une molécule d'AG et une molécule de lysophospholipide (surtout de la lysophosphatidylcholine). La phospholipase pancréatique A₂ requiert la présence de calcium et de sels biliaires pour être active. De plus, son activité optimum requiert un ratio molaire de sels biliaires versus PL de 2 : 1. La phospholipase est sécrétée en tant que proenzyme dans le jus pancréatique. Elle est activée dans le petit intestin par la trypsine.

Le cholestérol présent dans l'intestin provient de différentes sources: l'alimentation, la bile et la desquamation des cellules épithéliales. Le cholestérol ester est hydrolysé par la cholestérol estérase pancréatique en cholestérol libre et en AG. L'activité de la cholestérol estérase est augmentée en présence des acides biliaires, surtout les acides biliaires trihydroxy, tels que le sodium cholate. Seulement 10 à 15 % du cholestérol diététique est présent sous forme de cholestérol ester et ainsi, la majorité de ce cholestérol ne requiert pas d'hydrolyse pancréatique.(271,254)

A ce stade, les particules lipidiques possèdent toujours une solubilité limitée dans l'environnement aqueux du contenu intestinal. La bile sert de détergent pour la solubilisation des produits lipolytiques (AG, 2-MG) en permettant la formation des

micelles qui sont des agrégats polymoléculaires solubles dans l'eau. Ces micelles transportent donc les produits d'hydrolyse pancréatique ainsi que les phospholipides et le cholestérol biliaires.(271)

1.6.3.2 L'absorption des lipides par les entérocytes

Les produits lipolytiques sont absorbés dans le jéjunum proximal. Cette absorption intestinale requiert la dissociation des lipides solubilisés dans les micelles, car seulement des monomères peuvent traverser la bordure en brosse des entérocytes. Ce processus prend place pendant la diffusion des micelles à travers la couche aqueuse non-remuée de la surface endoluminale. En effet, l'existence d'un micro-environnement acide d'un pH de 5.3-6 à l'intérieur de cette couche d'eau favorise la dissociation micellaire et la protonation des AG. Ensuite, les AG, MG et LPC diffusent passivement à travers la membrane des microvillosités de l'entérocyte. Ce processus est initié et se déroule grâce à la présence d'un gradient de concentration entre les lipides luminaux et les lipides entérocytaires.(271) Toutefois, certaines observations suggèrent l'existence d'un transporteur transmembranaire pour les AG, le *fatty acid binding protein membranaire* (FABPpm) d'un poids moléculaire de 40 kDa.(303) Cette protéine essentiellement membranaire relarguera les acides gras dans le cytoplasme où d'autres types de FABP cytoplasmiques les prendront en charge. L'absorption des TG est un processus très efficace car 95 % des AG et des MG sont absorbés.(271)

Le cholestérol libre doit aussi entrer dans la composition des micelles pour franchir la phase aqueuse. De ce fait, la présence des sels biliaires est indispensable à l'absorption du cholestérol. Une fois la barrière de la couche d'eau immobile passée, le cholestérol est incorporé dans l'entérocyte par la diffusion passive. L'absorption du cholestérol n'est pas

aussi efficace que celle des TG. Seulement, 40-60% du cholestérol diététique est absorbé. Toutefois, la quantité absolue du cholestérol absorbé augmente en parallèle avec la quantité ingérée.(271)

Les AG à chaîne courte ou moyenne sont absorbés en partie directement dans la veine porte, sans passer préalablement par les processus décrits ci-haut. Ils sont alors transportés dans le plasma sous forme d'acides gras libres (AGL) fixés sur l'albumine.(254)

1.6.3.3 L'assemblage et la sécrétion des chylomicrons

En période post-prandiale les molécules lipidiques exogènes et endogènes sont assemblées par l'intestin dans la lipoprotéine appelée, le chylomicron. Le processus d'assemblage des chylomicrons est très complexe et n'est pas encore tout à fait élucidé. Les étapes principales présentées ici sont donc très simplifiées.

1. Le transport intracellulaire

Une fois dans l'entérocyte, les différentes molécules nouvellement absorbées sont transportées au réticulum endoplasmique (RE). La translocation des AG de la bordure en brosse jusqu'au réticulum endoplasmique lisse est médiée, cette fois-ci, par les FABP cytosoliques (14-15 kDa). Ces dernières jouent un rôle important dans le transport et l'utilisation intracellulaire des AG à chaîne longue.(143) Par ce fait, elles sont exprimées abondamment dans les tissus impliqués dans le métabolisme actif des lipides, tels que l'intestin, le foie et le tissu adipeux. Les FABP cytosoliques possèdent plusieurs isoformes dont la nomenclature est généralement basée d'après le nom du tissu où elles ont été identifiées en premier. Ainsi, il existe les I-FABP (intestin), L-FABP (foie), A-

FABP (tissu adipeux) et H-FABP (cœur). La distribution cellulaire des FABP est différente selon les tissus. Certains d'entre eux n'expriment qu'un seul type de FABP, d'autres plusieurs. L'expression et la distribution des FABP cytosoliques sont influencées par divers facteurs nutritionnels, développementaux et hormonaux.(301) Dans l'intestin on retrouve deux isoformes, les I-FABP et L-FABP. Le transport intracellulaire des lysophosphatidylcholines (LPC) et du cholestérol semble impliquer, quant à lui, une protéine cytosolique, la *sterol carrier protein* (SCP).(254)

2. La resynthèse cellulaire

Dans le réticulum endoplasmique lisse les différentes molécules lipidiques sont resynthétisées de nouveau :

- Les triglycérides

Les 2-MG et les AG sont reconstitués pour former les TG, par la voie de monoglycérides. La voie de monoglycérides est la voie principale de la resynthèse des TG comptant pour 70 %. Les 2-MG endogènes sont réacylés en TG par l'action consécutive de deux enzymes; la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) et la diacylglycérol acyltransférase (DGAT). Plus précisément, la MGAT catalyse la réaction par laquelle un monoacylglycérol est transformé en 1,2-diacylglycérol et la DGAT catalyse la réaction qui transforme ce dernier en triglycérides.(271)

La deuxième voie dans l'entérocyte pour élaborer les TG est la voie de l' α -glycérophosphate et elle compte pour 30 %. Cette voie implique l'acylation par étape de glycerol-3-phosphate (qui provient du métabolisme des glucides) pour former l'acide phosphatidique (1,2-diacylglycérol-3-phosphate). Ce dernier est le précurseur des TG et

des PL. En présence de la phosphate phosphohydrolase, l'acide phosphatidique est hydrolysé pour former les DG qui, à leur tour, sont convertis en TG. Dans cette voie métabolique, le glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) est l'enzyme limitante. Elle catalyse, en effet, la première acylation du glycérol-3-phosphate.(54) Les deux voies sont résumées dans la figure 9, ci-dessous.

Figure 9 : Les voies de synthèse de triglycérides

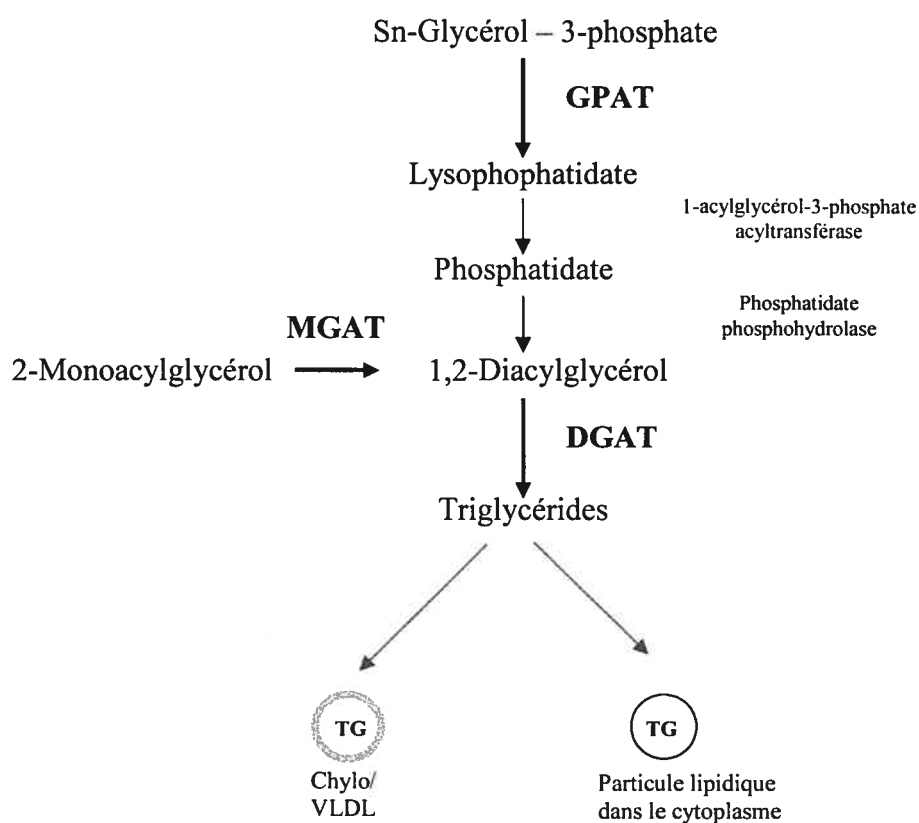


Fig. 9: La synthèse des TG peut avoir lieu par deux voies: la voie de monoglycérides et la voie de l' α -glycérophosphate. Dans la première, l'enzyme monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) catalyse la transformation de 2-monoacylglycérol en 1,2 diacylglycérol, tandis que la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) catalyse l'acylation de ce dernier pour former un TG. La deuxième voie, quant à elle, implique l'acylation de

glycerol-3-phosphate pour produire le lysophosphatidate par le glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT). Le lysophosphatidate, à son tour, se transforme en phosphatidate sous l'action de la 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase. Le phosphatidate (1,2-diacylglycérol-3-phosphate) est ensuite hydrolysé, par la phosphatidate phosphohydrolase, en 1,2-diacylglycérol. Finalement, ce dernier est converti en TG sous l'action de la DGAT. Les triglycérides ainsi synthétisés peuvent rentrer dans la formation des chylomicrons (intestin) et des VLDL (foie) ou être entreposés dans les particules lipidiques dans le cytoplasme.

La contribution de chaque voie dépend de la disponibilité des 2-MG endogènes et des AG. La présence de 2-MG et des AG en quantité suffisante favorise la voie de monoglycérides (période post-prandiale). A l'inverse, leur absence ou insuffisance (période de jeûne) favorise la voie de l' α -glycérophosphate.(254) La MGAT, la DGAT et la GPAT forment la triade des enzymes clé de la synthèse des TG. Elles sont impliquées dans la lipogénèse au niveau de l'intestin, mais aussi au niveau du foie et du tissu adipeux. Leur activité et leur contribution respectives varient en fonction des besoins des tissus et de la disponibilité des substrats.(54)

- Les phospholipides

Les lysophosphatidylcholines absorbées peuvent subir différentes réactions. Certaines d'entre elles sont reacylées afin de former les PC grâce à l'enzyme la lysophosphatidylcholine acyltransférase. D'autres sont hydrolysées en AG et le glycérol-3-phosphorylcholine. Les AG libérés par cette voie peuvent être utilisés dans la synthèse des TG. Finalement, une autre réaction qui peut se produire est la liaison de deux LPC pour former une molécule de PC et une molécule de glycéro-3-phosphorylcholine.

- Le cholestérol

Le cholestérol est estérifié par deux enzymes, la cholestérol estérase et surtout par l'acyl CoA : cholestérol acyltransférase (ACAT).(254)

3. L'assemblage

L'apoprotéine B est une glycoprotéine qui joue un rôle primordial dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en TG, tels que les chylomicrons et les VLDL. Par ailleurs, elle forme une partie intégrale de la particule de lipoprotéine et ne se dissocie à aucun moment. Elle existe sous deux formes, l'apo B 48 et l'apo B 100. Une observation très intéressante est que la production de ces deux protéines se fait à partir d'un seul et même gène appelé APOB exprimé dans le foie et dans l'intestin. Chez l'humain, l'apo B 100 (4536 aa) est synthétisée uniquement par le foie, tandis que sa forme plus petite l'apo B 48 (2152 aa) par l'intestin. L'explication de ce phénomène est la présence dans l'intestin d'un processus appelé l'editing de l'ARNm de l'apo B. Il implique une seule substitution post transcriptionnelle de l'ARNm de la base C (la cytidine) en U (l'uridine) à la position 6666, changeant ainsi le codon de la glutamine (CAA) pour le codon-stop (UAA). L'apparition prématurée de ce codon de terminaison arrête la synthèse protéique et donne naissance à une protéine contenant 48 % de la partie amino-terminale de l'apo B 100. Cette modification spécifique est catalysée dans le noyau par l'enzyme APOBEC-1 (*apo B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 1*).(64) (Voir figure10)

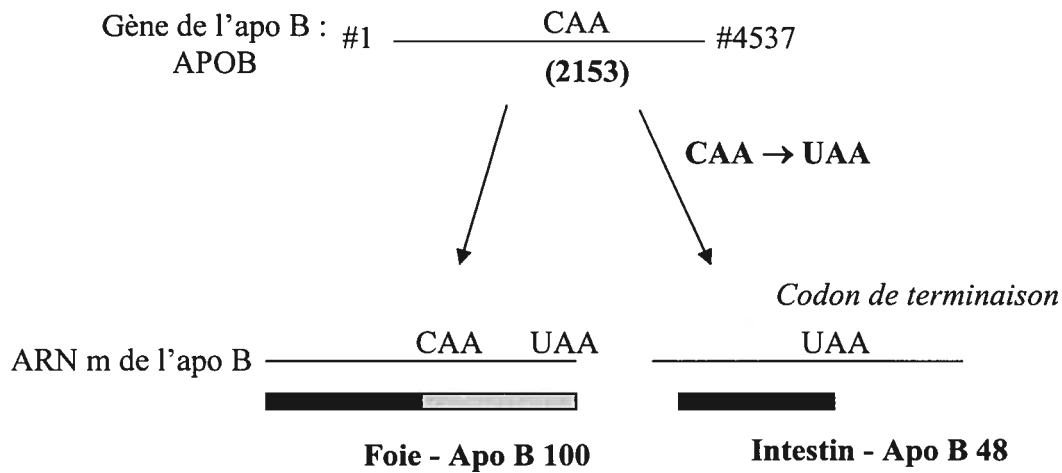
Figure 10 : L'Editing de l'ARNm de l'apo B

Fig. 10: La synthèse de l'apo B 100 et de l'apo B 48 se fait à partir du gène APOB, exprimé au niveau hépatique et intestinal. L'apo B 100, une protéine de 4536 aa, est produite exclusivement par le foie, tandis que l'apo B 48, une protéine de 2153 aa, l'est par l'intestin par un processus appelé editing de l'ARNm de l'apo B. Celui-ci implique une seule modification post-transcriptionnelle de la cytidine en uridine à la position 6666 de l'ARNm, changeant le codon de la glutamine (CAA) pour un codon stop (UAA). La présence de ce codon de terminaison arrête la synthèse protéique et donne naissance à une protéine contenant 48 % de la terminaison N de l'apo B 100.

Par ailleurs, de nombreux travaux, indiquent que la synthèse de l'apo B est constitutive et que le contrôle de sa production est exercé principalement par sa dégradation intracellulaire au niveau co- et post- translationnel. Comme nous le verrons plus loin, sa dégradation par le protéasome est diminuée par le processus de lipidation, impliquant la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP). (64,68) De ce fait, l'action de la MTP est essentielle à la formation des lipoprotéines. Cette protéine est localisée principalement dans la lumière du RE. Son rôle consiste à transférer les lipides autour de l'apo B 48 ou l'apo B 100, ce qui empêche leur dégradation par le protéasome et permet leur translocation dans la lumière du RE. La MTP est plus précisément un hétérodimère

composé de deux enzymes multifonctionnelles des poids moléculaires de 55,000 et de 97,000. La petite sous-unité est la *protein disulfide isomerase* (PDI). L'association de la MTP avec la PDI est nécessaire à son activité de transfert.(354) L'absence de MTP, caractéristique de la maladie appelée l'abêtalipoprotéinémie, se traduit par l'incapacité de produire des lipoprotéines riches en TG, ou des lipoprotéines contenant l'apo B (B 48 et B 100).(170,352)

D'après le modèle proposé aujourd'hui, l'assemblage des chylomicrons comporte deux étapes principales. Dans une première étape l'apo B 48, la protéine structurale des chylomicrons, est lipidée grâce à la MTP. On assiste à la formation d'une petite et dense particule. Dans une deuxième étape, les lipides sont ajoutés à la particule naissante d'apo B48, soit par la fusion avec une gouttelette lipidique riche en TG, soit par l'addition des molécules individuelles, soit par les deux. Le rôle de la MTP dans la première étape étant crucial, sa contribution dans la deuxième étape n'est pas très bien définie. L'équipe de Gordon a observé, en effet, que l'inhibition de la MTP bloque la première étape de la lipidation de l'apo B, mais n'exerce aucun effet sur la deuxième.(121)

D'autres apoprotéines sont aussi ajoutées à la molécule. La particule ainsi formée dans le RE, est transportée ensuite dans l'appareil de Golgi où la glycosylation de l'apo B 48, initiée dans le RE, est complétée. À ce stade la particule de préchylomicron est prête. Elle est alors mise dans les vésicules sécrétrices, transportée à membrane basale et sécrétée par exocytose.(25) Les principales étapes de l'assemblage de chylomicron sont schématisées dans la figure 11.

Figure 11 : L'assemblage et la sécrétion des chylomicrons.

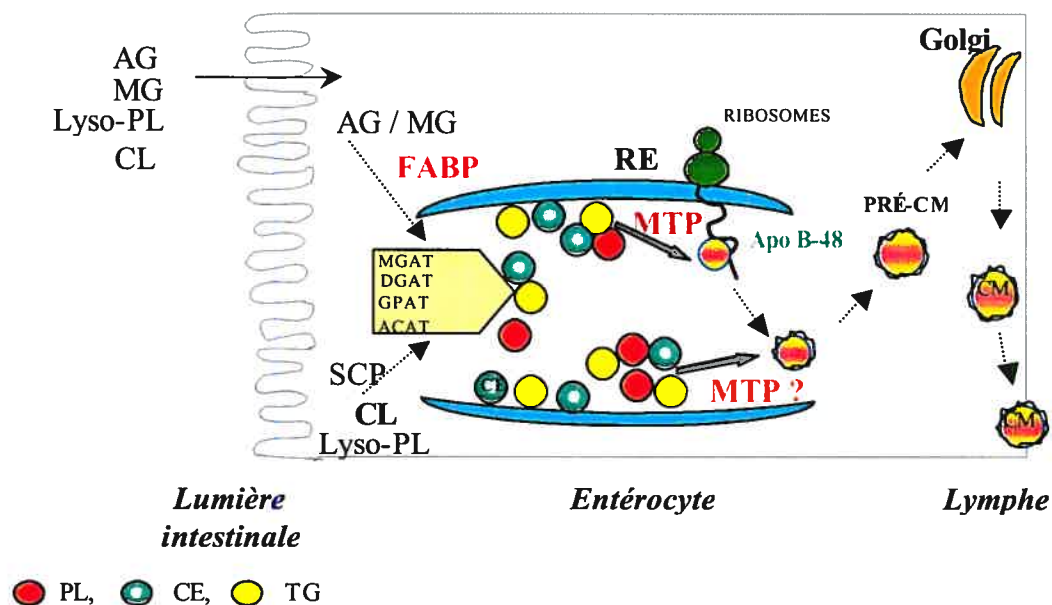


Fig. 11: Les lipides de la lumière intestinale hydrolysés traversent la membrane microvillositaire par différents mécanismes impliquant la diffusion simple ou des transporteurs. Une fois dans l'entérocyte, les AG et les MG sont transportés au RE par les FABP cytosoliques, tandis que le CL et les LCP par la SCP. Dans le RE, les lipides sont réestérifiés par l'action des diverses enzymes; les TG par l'action de la MGAT, la DGAT et la GPAT, le CE par l'action de l'ACAT et les PL par l'action de la lysophosphatidylcholine acyltransférase. Dans l'étape subséquente, les lipides sont transférés autour de l'apo B nouvellement synthétisée, par la MTP, ce qui prévient sa dégradation par le protéasome. D'autres lipides sont additionnés à la particule d'apo B ainsi formée, soit par la fusion avec une gouttelette lipidique, soit par l'addition des composantes lipidiques individuelles soit par les deux. Le rôle de la MTP dans la deuxième phase de lipidation est toujours sous investigation. D'autres apoprotéines sont ajoutées à la particule. À sa sortie du RE, le préchylomicron formé est transféré à l'appareil de Golgi pour y subir les dernières modifications. Le chylomicron est alors enveloppé par des vésicules golgiennes et acheminé à la membrane basale pour y être sécrété par exocytose dans la lymphe. ACAT; acyl-CoA: cholestérol acyltransférase, AG; acides gras, CE; cholestérol ester, CL; cholestérol libre, DGAT; diacylglycérol acyltransférase, FABP; fatty acid binding protein, Lyso-PL; lysophosphatidylcholines, MG; monoglycérides, MGAT; monoacylglycérol acyltransférase, PL; phospholipides, RE; réticulum endoplasmique, SCP; sterol carrier protein, TG; triglycérides.

Finalement, en période de jeûne l'intestin élabore une faible proportion des VLDL contenant l'apo B48 qui transportent les TG d'origine endogène.(25) Pour conclure, il est important de rappeler que l'intestin n'est pas "une porte d'entrée libre" des lipides. Le transport, l'assemblage et la sécrétion de ceux-ci sont contrôlés par différentes voies métaboliques. Les anomalies au niveau de ces dernières se refléteront sur les niveaux des lipides plasmatiques.

1.6.4 Transport et métabolisme des lipides

1.6.4.1 Les chylomicrons

Le chylomicron représente donc la première lipoprotéine en période post-prandiale. Sa fonction consiste à transporter et à distribuer des lipides (surtout les TG) endogènes et exogènes. Le chylomicron sécrété par la membrane basolatérale emprunte la circulation lymphatique avant de se rendre dans la circulation systémique par le canal thoracique. Dans la circulation, les chylomicrons contenant déjà l'apo B48 et l'apo A acquièrent des HDL d'autres apoprotéines, les apos C. Ils sont alors catabolisés très rapidement par les tissus extra-hépatiques, en particulier les tissus adipeux et musculaires. Plus précisément, ils subissent l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme attachée à l'endothélium vasculaire. Celle-ci en présence de l'apo CII, un co-facteur indispensable à son action, hydrolyse les TG en mono- et diglycérides et en acides gras, qui peuvent être utilisés pour une production immédiate d'énergie ou être entreposés sous forme des TG. Les acides gras libérés peuvent ainsi se lier à l'albumine et être acheminés vers différents tissus. Les chylomicrons s'appauvrissent en leur contenu en triglycérides. En même temps, ils s'enrichissent en CE cédé par les HDL et les LDL, auxquels ils transfèrent une petite partie des TG.(254) Cet échange

bidirectionnel est médié par la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP).(117) Ces changements induisent une perte d'affinité de la particule pour les apos C et A qui se détachent. Les particules résiduelles du catabolisme du chylomicron (chylomicron remnant) s'approprient l'apo E des HDL et reviennent au foie. Ce retour au foie peut se faire justement grâce à l'apo E reconnue par des récepteurs hépatiques. Une fois captées par le foie, toutes les composantes de la particule de chylomicron résiduel sont hydrolysées dans les lysosomes. Le chylomicron résiduel livre au foie une petite partie restante de TG, mais surtout il largue tout le cholestérol absorbé et le cholestérol acquis des autres lipoprotéines.(254)

1.6.4.2 Les VLDL

1. Assemblage

Le foie exporte les TG en excès dans les particules des VLDL. Rappelons qu'à l'image de l'entérocyte, les TG, composantes lipidiques principales des VLDL, sont synthétisées *de novo* par les enzymes telles que la GPAT, la DGAT et la MGAT. D'autre part, l'assemblage de VLDL par les hépatocytes comportent essentiellement les mêmes étapes que pour la particule de chylomicron, la phase cruciale étant la sécrétion de leur apoprotéine principale, l'apo B 100. Dans le foie, l'apo B est synthétisée sous sa forme intégrale donnant naissance à une protéine de 4536 aa.(68) Il a été observé dans les cellules HepG2 qu'une proportion significative de l'apo B nouvellement synthétisée (> 60 %) est dégradée avant même d'être sécrétée. D'après les connaissances actuelles, la principale voie de dégradation implique la conjugaison de l'apo B à l'ubiquitine suivie de sa dégradation par le protéasome dans le cytosol.(99,369). D'ailleurs, l'incubation des

cellules hépatiques HepG2 avec un inhibiteur du protéasome, l'ALLN (N-acetyl-L-Leuciny—L-leuiny—L-norleucinal), bloque la dégradation intracellulaire de l'apo B.(369) De plus, l'association entre l'apo B et la *heat shock protéin 70* (Hsp70), une protéine cytosolique, constitue un prérequis à cette voie de dégradation.(99)

D'autre part, diverses études ont remarqué que l'incubation des cellules HepG2 avec l'acide oléique inhibe la dégradation de l'apo B et dirige la particule vers les voies de sécrétion.(68,80,99) L'apoprotéine B non lipidée ou insuffisamment lipidée est, en effet, sujet à la dégradation au stade co- et post -translationnel, et ce par le processus médié par son transport rétrograde de la lumière du réticulum endoplasmique vers le cytosol. La lipidation protège donc l'apo B de la dégradation, et est un processus indispensable à sa sécrétion. Il est important de rappeler que, tout comme dans l'intestin, l'action de la MTP est primordiale dans la première lipidation de l'apo B.(64) En effet, l'incubation des cellules HepG2 avec un inhibiteur de MTP, le BMS-200150, bloque la sécrétion de l'apo B.(152) Par ailleurs, la disponibilité des lipides peut, elle aussi, être déterminante dans ce processus.(216) La régulation de la sécrétion de l'apo B 48 et 100 est résumée dans la figure 12.

Figure 12 : La régulation de la sécrétion de l'apo B

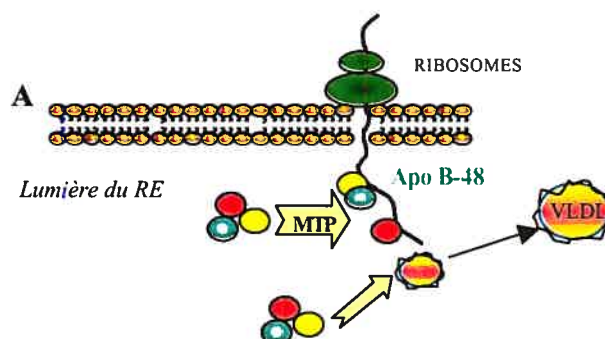


Fig 12-A: Durant sa translocation l'apo B est lipidée par l'action de la MTP. Cette première phase de lipidation lui permet de se déplier correctement et empêche sa dégradation par le protéasome. D'autres lipides viennent s'ajouter au complexe ainsi formé, produisant la particule de VLDL (foie) ou le chylomicron (intestin).

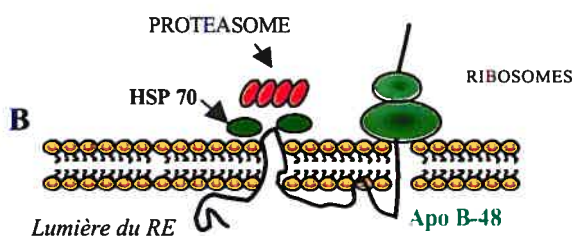


Fig.12-B: Par contre, l'apoprotéine B non lipidée subit un transport rétrograde de la lumière du réticulum endoplasmique vers le cytosol, où elle est dégradée par le protéasome, après son association avec la *heat shock protéin 70* (Hsp70).

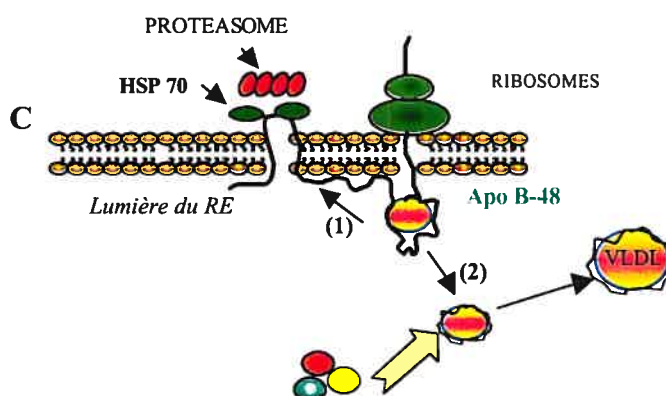


Fig.12-C: Finalement, l'apoprotéine B insuffisamment lipidée peut être dirigée vers (1) la voie de dégradation par le protéasome ou (2) la voie de sécrétion, pour y subir une deuxième phase de lipidation.

● PL, ● CE, ● TG

2. Catabolisme

Les VLDL secrétées possèdent à leur surface l'apo B 100, l'apo E et l'apo C qui sont toutes synthétisées par le foie. D'autres apos C et E sont acquises en circulation. Les VLDL sont donc des particules très riches en TG et constituent le véhicule privilégié de transport des TG endogènes. Le métabolisme des VLDL est très semblable à celui des chylomicrons; l'hydrolyse de leur contenu en TG s'effectue par l'intervention de la LPL des tissus extra-hépatiques et l'enrichissement en CE provenant des HDL en échange des TG. Une partie des particules résiduelles des VLDL est reprise par le foie par l'intermédiaire des récepteurs hépatiques B/E. Une autre partie reste en circulation. À l'heure actuelle il semble que la taille originale des VLDL soit un facteur décisif quant au sort des VLDL résiduelles. Les niveaux plasmatiques des VLDL sont donc déterminés par 1) leur taux de sécrétion et 2) le niveau d'activité de la LPL.(116,117)

1.6.4.3 Les IDL

Une partie des VLDL résiduelles restent dans la circulation plasmatique et elles sont appelées les IDL. Les IDL subissent d'autres processus métaboliques qui impliquent l'hydrolyse des TG et des PL par la lipase hépatique (LH), une enzyme qui se trouve à la surface des hépatocytes. De plus, comme les chylomicrons et les VLDL, les IDL acquièrent du CE des HDL en échange des TG.(116,117)

1.6.4.4 Les LDL

Le catabolisme des IDL donne naissance à des particules dépourvues de TG et très riches en CE, appelées les LDL. Les LDL ainsi formées constituent le principal transporteur du cholestérol plasmatique. Il faut ajouter qu'une partie des LDL peut être

secrétée directement par le foie. Peu importe leur origine, la composition des LDL peut être affectée par la présence d'autres lipoprotéines et par l'activité de la CETP. En effet, l'enrichissement des LDL en TG les expose à l'action de la LPL, mais principalement à celle de la LH, générant des LDL petites et denses. Ces dernières n'étant pas aussi bien reconnues par les récepteurs LDL, restent plus longtemps dans la circulation où elles peuvent subir diverses modifications telles que l'oxydation et/ou la glucosylation.(116,117)

Les LDL sont captées par le foie et par les tissus extra hépatiques nécessitant le cholestérol. Ce processus se déroule par le biais d'un récepteur spécifique, le récepteur LDL. En bref, après avoir réagi avec le récepteur LDL, toute la particule LDL est internalisée et dégradée dans les lysosomes où le cholestérol ester est hydrolysé. Le cholestérol est ensuite libéré dans le cytoplasme où il participe à sa régulation intracellulaire. D'une part, il inhibe l'HMG-CoA réductase, l'enzyme responsable de la synthèse du cholestérol, et il stimule l'activité de l'ACAT, l'enzyme responsable de l'estérification du cholestérol. D'autre part il diminue le nombre des récepteurs à la surface de la cellule, empêchant ainsi la captation exagérée des LDL.(35,36,78)

Les niveaux de LDL plasmatiques sont donc déterminés par 1) les taux de sécrétion des lipoprotéines hépatiques contenant l'apo B 100, 2) l'efficacité de la conversion des VLDL en IDL et en LDL et 3) le taux du catabolisme des LDL médié par le récepteur LDL.(116)

1.6.4.5 Les HDL

Les HDL sont des lipoprotéines responsables du transport inverse du cholestérol, un processus par lequel le cholestérol est prélevé des tissus périphériques et transporté

au niveau du foie pour y être métabolisé. La plupart des cellules non-hépatiques, à l'exception des cellules stéroïdiennes, sont incapables de dégrader le cholestérol et dépendent des HDL pour enlever l'excès du cholestérol et assurer le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Les HDL représente une classe complexe des lipoprotéines. Ils comportent plusieurs sous-classes qui démontrent des différences dans la taille, la densité et la composition lipidique. La formation des HDL comporte plusieurs étapes. Les apoprotéines majoritaires des HDL, l'apo AI et l'apo AII, secrétées au niveau du foie et de l'intestin, seules ou associées à des faibles quantités des phospholipides, donnent naissance à des particules discoïdales appelées les HDL naissantes. Une grande proportion des HDL naissantes est également générée dans le plasma par dissociation des apos et des PL de la surface des lipoprotéines riches en TG suite à l'action de la LPL. Les HDL naissantes sont des particules acceptrices initiales du cholestérol libre intracellulaire. En interagissant au niveau des sites de liaison, elles prélèvent du CL de la membrane des cellules extra-hépatiques. Cet efflux du cholestérol est médié par l'apo AI et représente la première étape du transport inverse du cholestérol.(339) La protéine *ATP binding cassette 1* (ABC1) semble jouer un rôle crucial dans ce processus, même si les mécanismes d'action sont encore mal connus. En effet, le défaut d'ABC1, caractéristique de la maladie de Tangier, se traduit par l'absence complète ou par des niveaux très abaissés des HDL et une accumulation des esters du cholestérol dans plusieurs tissus.(274) Le CL prélevé par les HDL est ensuite estérifié en CE par l'enzyme la lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT). Le CE se déplace alors de la surface au noyau de la lipoprotéine. La formation de CE augmente la capacité de la particule d'absorber plus de CL. De plus, l'enrichissement en CE et en phospholipides transforme

graduellement la particule en HDL₃ et induit progressivement la perte d'affinité pour l'apo AI, ce qui prévient le captage futur du CL. L'acquisition des TG des autres lipoprotéines en échange du CE donne naissance à la particule mature des HDL₂. Cette dernière subit alors l'hydrolyse de ses TG et de ses PL par la LH. Simultanément, elle s'appauvrit en son contenu en CE, par l'exportation de molécules de cholestérol ester vers les VLDL et les LDL, un processus médié par la CETP. Par ailleurs, les HDL₂ peuvent aussi distribuer le CE aux organes stéroïdiens et au foie par le biais du récepteur, le *scavenger receptor-class B type1* (SR-B1). La liaison entre le SR-B1 avec les HDL₂ induit un passage du CE de la particule de la lipoprotéine au tissu. Ainsi, par la perte de ses composantes lipidiques (TG, CE et PL), les HDL₂ sont retransformées en HDL₃, qui peuvent à nouveau rentrer dans la voie de transport inverse de cholestérol. Finalement, la conversion des HDL₃ en HDL₂, et subséquemment la transformation des HDL₂ en HDL₃, libèrent l'apo AI non lipidée ou peu lipidée, qui peut servir d'accepteur initial du cholestérol intracellulaire.

Le transport inverse du cholestérol médié par les HDL se fait donc par l'intermédiaire de deux mécanismes. Le mécanisme direct implique le retour du cholestérol au foie par les HDL elles-mêmes. Les HDL en circulation sont captées par le foie auquel elles délivrent leur contenu en cholestérol. Le mécanisme indirect implique le transfert du CE des HDL aux autres lipoprotéines, qui à leur tour seront captées et catabolisées par le foie.

Les niveaux plasmatiques des HDL sont déterminés principalement par 1) la disponibilité des apoprotéines, 2) le niveau d'activité de la LCAT, 3) les niveaux plasmatiques des lipoprotéines riches en TG, 4) le niveau d'activité de la CETP et 5) le

niveau de la captation des lipides des HDL par les tissus périphériques et par le foie.(339)

En bref, le métabolisme des lipoprotéines est une cascade d'événements biochimiques dynamiques. Il est donc clair que les dérangements au niveau de n'importe quel site de ce processus affecte l'ensemble du système à cause de la présence des multiples interrelations entre les différents intervenants. Les origines et les principales fonctions des différentes lipoprotéines sont résumées dans le tableau 7 et schématisées dans la figure 13.

Tableau 7 : Origine et fonctions principales des lipoprotéines		
Lipoprotéines	Source principale	Fonction principale
Chylomicron	Intestin	Transport des TG exogènes
VLDL	Foie	Transport des TG endogènes
IDL	Catabolisme des VLDL	Transport des TG endogènes
LDL	Catabolisme des IDL, foie	Transport du cholestérol aux tissus périphériques
HDL	Foie (15%), intestin(15%), plasma (70%)	Transport inverse du cholestérol : des tissus périphériques vers le foie

Figure 13 : Le métabolisme des lipoprotéines

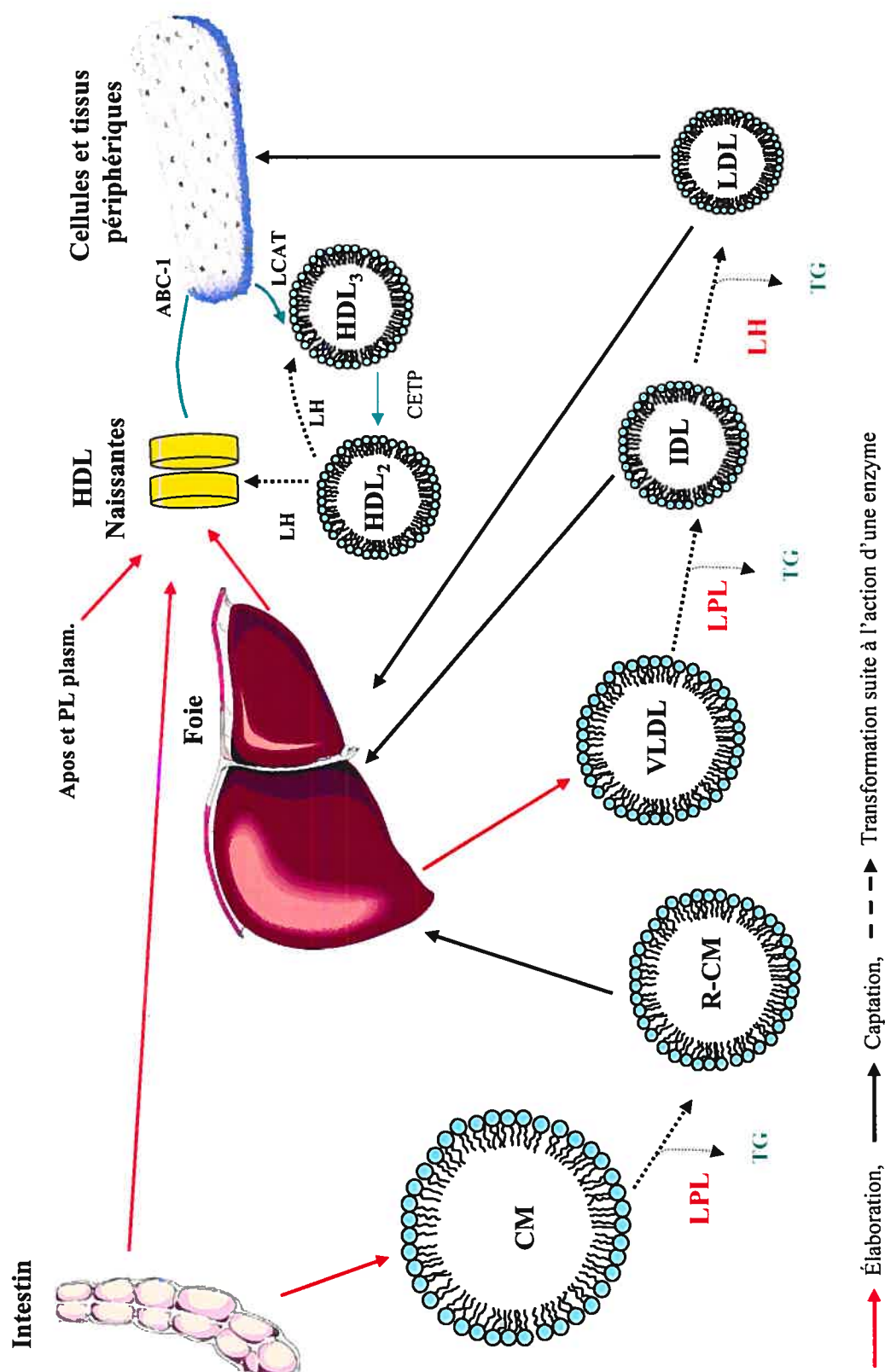


Fig. 13: Le métabolisme lipoprotéinique représente une séquence d'événements très complexes dont les principaux sont présentés dans le présent schéma. Ainsi, en période post-prandiale, l'intestin élabore le chylomicron, dont la fonction principale consiste à transporter les TG exogènes. Une fois dans la circulation, celui-ci subit l'hydrolyse de ses TG, sous l'action de la LPL. Appauvri en contenu triglycérique, il devient une particule résiduelle (R-CM) qui sera captée et métabolisée par le foie. Le foie, quant à lui, exporte les lipides (surtout les TG) endogènes excédentaires dans la particule lipoprotéique VLDL. À l'image des chylomicrons, les VLDL subissent l'hydrolyse de leur contenu en TG par l'intervention de la LPL, ce qui les transforme en lipoprotéines IDL. Ces dernières peuvent alors être captées et métabolisées par le foie ou demeurer dans la circulation. Dans ce dernier cas, ils subissent l'hydrolyse des TG et des PL par la LH et acquièrent du cholestérol provenant des autres lipoprotéines. Ces processus les transforment en particule LDL, principal transporteur plasmatique du cholestérol. Les LDL, à leur tour, peuvent être captées et métabolisées par le foie ou elles peuvent être prises par les tissus extra-hépatiques nécessitant du cholestérol. Finalement, les HDL représentent une classe des lipoprotéines impliquées dans le transport inverse du cholestérol. Les HDL naissantes, particules discoïdales, sont surtout générées dans le plasma, mais aussi par le foie et l'intestin. Elles extraient le cholestérol libre des membranes des cellules extra-hépatiques par un processus faisant intervenir la protéine ABC1. Le CL, ainsi soustrait et estérifié en CE par la LCAT, se déplace de la surface au noyau de la particule. L'enrichissement en CE transforme graduellement la particule en HDL₃. Celle-ci, en acquérant des TG en échange du CE, processus médié par la CETP, donne naissance à des HDL₂. Finalement, les HDL₂ subissent l'hydrolyse des TG et des PL par l'action de la LH tout en s'appauvrissant en leur contenu en CE, ce qui les rétransforme en HDL₃. ABC-1; ATP binding cassette 1; CETP; Cholesteryl ester transfer protein, CM; chylomicron, HDL; High density lipoprotein; IDL; Intermediary density lipoprotein, LCAT; lécithine : cholestérol acyltransférase, LH; lipase hépatique, LDL; Low density lipoprotein, LPL; lipoprotéine lipase, PL; phospholipides, R-CM; chylomicron résiduel, TG; triglycérides, VLDL; Very low density lipoprotein

1.6.5 Régulation hépatique du cholestérol

Le foie est le "carrefour" métabolique du cholestérol et est l'organe principal du catabolisme du cholestérol. Les différentes lipoprotéines sont, en effet, épurées de la circulation par le foie auquel elles délivrent leur contenu en cholestérol. Le foie est en mesure d'en disposer de plusieurs façons. Le cholestérol hépatique en excès, une fois estérifié grâce à l'enzyme l'ACAT, peut être incorporé dans les nouvelles lipoprotéines qui seront excrétées dans la circulation ou il peut aussi être stocké dans les gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes.(216,78) Le foie est aussi le seul organe responsable de l'élimination du cholestérol de l'organisme. Le cholestérol peut être excrété directement dans la bile ou il peut rentrer dans la voie de formation des acides biliaires, qui seront sécrétés dans la bile. La cholestérol 7 α hydroxylase est l'enzyme limitante dans la voie de synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol.(338) Le foie est aussi l'un des sites majeurs de la synthèse du cholestérol, l'HMG-CoA réductase en étant l'enzyme limitante de ce processus. Ces différentes voies métaboliques sont interreliées, ce qui assure l'homéostasie du cholestérol. L'un des exemples importants concerne les acides biliaires. Ainsi, la majorité des acides biliaires (94%), après avoir rempli leur fonction dans le duodénum, retournent au foie par le cycle entero-hépatique. Ce retour inhibe la cholestérol 7 α hydroxylase et l'HMG-CoA réductase, ce qui a pour effet une diminution de la synthèse du cholestérol et des acides biliaires.(273,337)

La régulation du cholestérol hépatique est donc sous le contrôle très serré des voies impliquées dans la synthèse du cholestérol, dans sa mise en réserve, dans son élimination dans la bile et dans la captation des LDL et des autres lipoprotéines. Les voies impliquées dans la régulation du cholestérol hépatique sont présentées dans la figure 14.

Figure 14 : La régulation du cholestérol hépatique

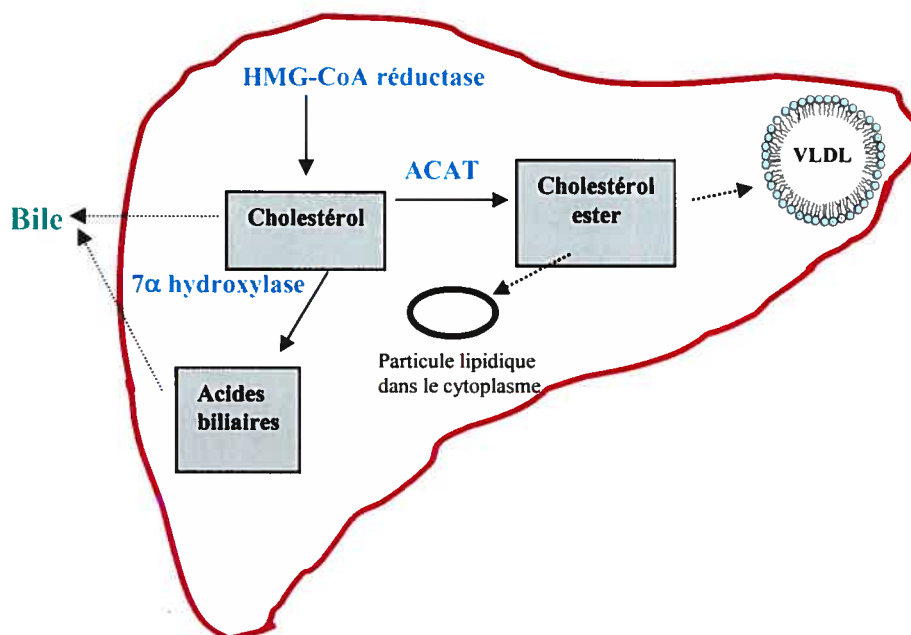


Fig. 14 : La régulation hépatique du cholestérol est sous contrôle serré des différentes voies métaboliques. En premier lieu, le foie est l'un des sites majeurs de la synthèse du cholestérol, l'HMG-CoA réductase en étant l'enzyme limitante de ce processus. Le cholestérol nouvellement synthétisé ou provenant de la circulation, une fois estérifié par l'action de l'enzyme ACAT, peut être incorporé dans les nouvelles macromolécules de VLDL qui seront excrétées dans la circulation ou elles peuvent être stockées dans les gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme.(216,78) Par ailleurs, le cholestérol libre en excès peut être excrété directement dans la bile ou il peut rentrer dans la voie de formation des acides biliaires qui seront sécrétés dans la bile. La cholestérol 7α hydroxylase est l'enzyme limitante dans la voie de synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol.

Comme nous venons de le voir, le métabolisme des lipides et des lipoprotéines est un processus très complexe qui, dans les conditions physiologiques normales assure l'homéostasie totale et les différents besoins tissulaires en TG et en cholestérol. Rappelons que, sa régularité dépend essentiellement du bon fonctionnement des diverses

enzymes, protéines de transfert intra- et extra- cellulaires, récepteurs et autres acteurs qui y sont impliqués activement. D'autre part, il arrive que le système fasse défaut et l'apparition des désordres lipidiques s'en suit. Certains d'entre eux ont pu être reliés à une ou des anomalies spécifiques de métabolisme. Tel est souvent le cas des dyslipoprotéinémies congénitales qui peuvent se traduire par des hypo- ou hyperlipoprotéinémies. Parmi les hypolipoprotéinémies, mentionnons l'abêtalipoprotéinémie causée par l'absence de la MTP et caractérisée par l'absence des lipoprotéines riches en TG.(352) Quant aux hyperlipoprotéinémies, nous pouvons donner l'exemple de l'hypercholestérolémie familiale caractérisée par une hyperbêtalipoprotéinémie. Dans ce cas, le défaut primaire est une mutation du gène du récepteur aux LDL.(65)

Cependant, certains désordres lipoprotéinémiques, surtout secondaires à d'autres perturbations métaboliques, restent encore mal expliqués. Parmi eux, on compte malheureusement la dyslipidémie diabétique. Nous allons parcourir la littérature sur ce sujet afin de faire le point sur les connaissances et les lacunes l'entourant.

1.6.6 Anomalies lipidiques observées dans le diabète de type 2

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les dyslipidémies retrouvées chez les sujets diabétiques de type 2 possèdent trois composantes majeures qui sont une hypertriglycémie, une diminution du HDL- cholestérol, et une prépondérance des particules des LDL petites et denses.(92,110) Malheureusement, la liste complète des désordres lipidiques, dans la population diabétique, est beaucoup plus ample et alarmante.

1.6.6.1 L'hypertriglycémie

L'hypertriglycémie est l'anomalie lipidique la plus fréquemment retrouvée dans le diabète de type 2.(114) Elle est liée essentiellement à une augmentation des concentrations des lipoprotéines riches en triglycérides, telles que les VLDL.(297) Rappelons que les concentrations des VLDL plasmatiques reflètent leur taux de sécrétion et/ou leur taux de catabolisme par le tissu adipeux. Dans l'état post-prandial, l'augmentation de l'insulinémie est une condition nécessaire et suffisante afin de stimuler l'activité de la LPL dans le tissu adipeux.(256) Or, un fait remarquable est que son activité dans le tissu adipeux est diminuée chez les diabétiques, conséquent à la résistance périphérique à l'insuline.(249) La diminution de l'activité de la LPL se traduirait par un ralentissement de l'hydrolyse des TG des VLDL et par leur augmentation plasmatique.

Toutefois, diverses études suggèrent que l'hypertriglycémie est causée principalement par une production hépatique accrue des VLDL, qui comme nous allons le voir, semble être une conséquence de la résistance à l'action d'insuline. Les études *in vitro* et *in vivo* ont observé que l'action aiguë d'insuline consiste à inhiber la production hépatique des VLDL.(197) L'insuline exercerait cette action par un effet direct sur le foie en inhibant la production des VLDL-TG et des VLDL-apo B. L'insuline supprimerait aussi la production des VLDL par un effet indirect via la modulation des concentrations plasmatiques des AGL, la disponibilité des ces derniers étant un facteur très important dans la régulation des VLDL hépatiques. Les études *in vitro* ont démontré que les AGL stimulent la production des VLDL-TG et de l'apo B.(197) La synthèse des TG peut-être favorisée par l'afflux de substrats au foie, tels que les AGL et aussi le glycérol et le glucose. L'élévation des niveaux des TG hépatiques qui en résulte, inhibe

la dégradation de l'apo B par le protéasome, et dirige la particule vers la voie de sécrétion en tant que VLDL. L'impact stimulateur des AGL est si important que leur présence atténue même l'effet inhibiteur direct de l'insuline sur la production hépatique des VLDL.(197,296)

Cependant, le schéma est très différent quant il s'agit d'un état d'hyperinsulinémie. Ce dernier est en effet associé à une augmentation de la production des VLDL hépatiques.(296,310) Une résistance à l'effet aigu de l'insuline sur la suppression des VLDL a été observée dans les cellules HepG2, suite à leur exposition prolongée à l'insuline.(63) Par ailleurs, la production des VLDL par les hépatocytes des rats Zucker fa/fa obèses et hypertriglycéridémiques n'a pu être inhibée par la présence des taux élevés d'insuline.(292) Malheureusement, les mécanismes à la base de ce phénomène sont encore très peu connus. Actuellement, on sait que la résistance à l'insuline et le diabète se caractérisent par l'augmentation du flux des AGL et du glycérol, causé lui-même par des altérations de la lipolyse dans le tissu adipeux.(187) L'arrivée de ces substrats lipogéniques au foie stimulerait donc la synthèse des TG et des VLDL. De plus, certaines études suggèrent que la production des TG serait plus élevée que celle de l'apo B, ce qui expliquerait la sécrétion des VLDL de grande taille enrichies en TG.(335,313) Toutefois, les processus intrahépatiques impliqués restent à investiguer. Le foie est responsable de la production et la dégradation des apoprotéines B par l'intermédiaire des différentes voies métaboliques, elles-mêmes soumises à l'action des plusieurs enzymes et protéines de transfert. Une fois de plus, plusieurs questions s'imposent : quelles sont les voies impliquées ?, quelles enzymes sont affectées par l'état d'hyperinsulinémie ?, comment l'apo B est modulée intracellulairement ?

L'action inhibitrice de l'insuline sur la sécrétion des VLDL en période post- prandiale serait importante pour la prévention de la compétition avec les chylomicrons. La résistance à l'action d'insuline à ce niveau pourrait donc être responsable de l'hyperlipidémie post- prandiale fréquemment observée chez les personnes diabétiques.(314,212,57,357) Cette dernière se caractérise, par ailleurs, par une augmentation des particules résiduelles des VLDL, mais aussi des chylomicrons. Cette observation est des plus importantes, car les chylomicrons résiduels ont aussi été impliqués dans la progression des maladies coronariennes.(167) Il est donc assez surprenant de constater le peu d'information concernant la présence persistante des ces particules. En particulier, la contribution de l'intestin n'a pas été étudiée. Pourtant, l'accumulation des chylomicrons résiduels pourrait être causée par une biogenèse augmentée. D'ailleurs, une étude portant sur un modèle animal de résistance à l'insuline, le hamster syrien soumis à une diète riche en fructose, a permis de constater une surproduction des lipoprotéines intestinales.(131) Il serait primordial d'approfondir ces observations et d'explorer les voies métaboliques impliquées.

Finalement, les VLDL démontrent diverses anomalies qualitatives. Tel que mentionné ci-haut, elles se présentent sous forme de particules enrichies en TG. De plus, elles présentent une augmentation des apos E par rapport aux apos C.(351,175) Ces modifications sont très importantes, car tout changement dans la composition de la lipoprotéine altère son catabolisme normal et celui des autres particules lipoprotéïnémiques, compte tenu de leur interrelation.

1.6.6.2 Les concentrations abaissées des HDL-cholestérol

La diminution de HDL-cholestérol surtout aux dépens de leur fraction HDL₂, et un abaissement des taux sériques de l'Apo AI, est une deuxième observation constante. Plusieurs mécanismes, dont certains encore mal connus, semblent être à la base de cette anomalie. Premièrement, l'abaissement des concentrations de HDL-cholestérol pourrait être la conséquence d'un catabolisme accéléré des HDL₂. En effet, la concentration élevée des lipoprotéines riches en triglycérides semble stimuler l'échange des lipides neutres facilité par la CETP.(213,315) De plus, l'obésité est, elle-même, associée à une augmentation de l'activité de la CETP.(84,210) Plus précisément, cette dernière catalyse le transfert des TG des VLDL aux HDL₂ en échange du CE. Le transfert excessif rendrait la particule des HDL₂ très riche en TG qui seraient rapidement hydrolysés, à cause d'une activité élevée de la lipase hépatique, observée chez les sujets résistants à l'insuline et les diabétiques de type 2.(309,312)

Deuxièmement, une diminution de la production des HDL pourrait contribuer à la diminution observée. En effet, une altération du catabolisme des VLDL accompagnée par une diminution de l'activité de la LPL pourrait diminuer la transformation des HDL₃ en HDL₂ en retardant le transfert des apoprotéines et des phospholipides à ces dernières. Troisièmement, diverses études suggèrent que l'augmentation des taux du catabolisme de HDL-apo A-I, observée chez les diabétiques, pourrait représenter un autre mécanisme important responsable de la diminution du HDL-cholestérol.(105) La modification de la particule des HDL, par enrichissement en TG, hausserait en effet le taux de catabolisme de l'apo A-I.(141,114)

Finalement, le diabète de type 2 s'accompagne par des altérations dans le processus du transport inverse du cholestérol. Les particules de HDL présentent une capacité

diminuée à induire l'efflux du cholestérol. Les diverses anomalies mentionnées ci-haut pourraient en être à l'origine, de même que la glucosylation de l'Apo AI, et des anomalies au niveau de l'activité de la LCAT.(42)

En conclusion l'hypertriglycémie semble être un facteur majeur de la concentration du HDL-cholestérol. D'ailleurs, plusieurs études indiquent que les taux des triglycérides sont inversement corrélés avec ceux du HDL-cholestérol.(315,66,269) Dans ce contexte, il est clair que la compréhension des perturbations menant à l'hypertriglycémie devrait être sans aucun doute l'objectif visé principal.

1.6.6.3 Les anomalies qualitatives et quantitatives des LDL

Le troisième élément du profil athérogène est l'altération dans la composition des LDL, générant des particules petites et denses. De plus, l'hypertriglycémie, comme pour les HDL, semble être le déterminant majeur de leur présence.(21,251) L'activité augmentée de la CETP induit le transfert des TG des VLDL aux LDL, en échange du CE. La particule des LDL s'enrichit donc en TG et devient un substrat pour la LPL, mais surtout pour la lipase hépatique.(21,251) En effet, il existe une forte corrélation positive entre l'activité de la lipase hépatique et la concentration plasmatique des petites et denses particules des LDL.(372,347) La particule hydrolysée est très riche en protéines et dépourvue des lipides. De plus, la taille des VLDL est aussi un facteur important. Les études cinétiques suggèrent que les VLDL larges, qui sont le trait caractéristique de l'hypertriglycémie, donnent naissance à des particules des LDL petites et denses.(76,111)

Les LDL petites et denses présentent une diminution de l'affinité pour le récepteur B/E et par ce fait leur catabolisme est ralenti.(109) L'hyperglycémie aggrave la situation en

induisant la glucosylation de l'apo B ce qui altère le métabolisme normal des LDL. Un séjour prolongé dans le plasma les rend plus vulnérables à être captées et retenues dans l'espace sous-endothélial, contribuant à la genèse de la plaque d'athérome. La glucosylation de l'apo B des LDL augmente aussi la susceptibilité de la particule à l'oxydation et, de plus, elle lui procure certaines propriétés prothrombotiques qui restent à définir.(69)

L'hypercholestérolémie peut être observée dans la population diabétique. Comme nous l'avons expliqué, le foie est au centre de l'homéostasie du cholestérol et des anomalies à ce niveau ont le potentiel d'être à l'origine des perturbations du cholestérol. Il serait donc intéressant de vérifier le comportement des principales enzymes impliquées dans la préservation de cette homéostasie, face aux différents éléments qui accompagnent les états prédiabétiques et diabétiques.

1.6.6.4 Les maladies non-alcooliques du foie gras

Les maladies non-alcooliques du foie gras sont des conditions dont le potentiel de progresser vers des maladies hépatiques terminales est de plus en plus reconnu. De plus, l'état de stéatose qui se caractérise par l'accumulation hépatique intracellulaire des lipides, principalement des triglycérides, est un pré-requis à leur développement. L'obésité, le diabète de type 2 et l'hypertriglycémie augmentent le risque de développer ces anomalies. Il n'est donc pas surprenant que les personnes obèses et les diabétiques de type 2 représentent un pourcentage important des patients atteints des ces pathologies. L'anomalie métabolique primaire induisant la rétention des lipides au niveau du foie n'est pas encore clarifiée, mais elle implique sûrement différentes

altérations dans le métabolisme des lipides qu'il serait intéressant d'investiguer.(5,187,332)

Pour conclure, nous pouvons dire que malgré les progrès considérables réalisés dans le domaine de la lipidologie, notre compréhension de l'étiologie des anomalies lipidiques retrouvées dans le diabète, demeure toujours restreinte. Des études additionnelles sont évidemment nécessaires afin d'élucider les causes de ces perturbations. Mais, ce qui manque principalement à notre appréciation de ces dyslipidémies est une vue d'ensemble. Les travaux orientés vers les dyslipidémies diabétiques se sont souvent limités à un système en particulier; la périphérie, le foie ou l'intestin. Pourtant, il serait essentiel d'étudier l'interrelation des différents organes dans la genèse et l'évolution de ces désordres, et ce dans l'état prédiabétique et diabétique. La connaissance de cette relation augmenterait notre efficacité de prévention et de traitement des différentes dyslipidémies. Pour effectuer ces recherches, il faudra premièrement disposer d'un modèle approprié. Dans le chapitre suivant, nous présenterons un animal qui, selon nous, possède toutes les caractéristiques recherchées pour ce genre d'études.

1.7. Modèle animal

Les études cliniques ont beaucoup de limitations méthodologiques et éthiques. Par contre, le modèle animal constitue une alternative appréciable pour l'étude de la physiopathologie. De plus, l'utilité et la pertinence du modèle choisi résident dans sa capacité de reproduire les diverses caractéristiques métaboliques de la pathologie investiguée. Tel que mentionné auparavant, nous voulons étudier l'impact individuel des diverses composantes du diabète de type 2 sur les désordres lipidiques. Pour cela nous

désirons nous appuyer sur un modèle animal de résistance à l'insuline et de diabète, qui se rapproche le plus du développement de la "diaobésité" typiquement humaine. Le *Psammomys obesus* est un modèle remarquable car, comme nous allons le voir, l'exposition à une diète de laboratoire fait ressortir chez lui le phénotype diabétique, tel qu'observé chez les Indiens Pima.

1.7.1 *Psammomys obesus*

Le *Psammomys obesus*, souvent appelé le rat de sable, est en effet une gerboise vivant dans les régions désertiques d'Afrique du Nord et de la Méditerranée orientale. Dans son environnement naturel, il se nourrit exclusivement des plantes halophiles (*Atriplex halimus*) dont le contenu en énergie est très faible. En captivité et exposé à une diète de laboratoire, riche en énergie par opposition à son régime nutritionnel natif, cet animal développe séquentiellement une obésité, une hyperinsulinémie et un diabète de type 2.(279,282,162) En effet, il démontre divers signes caractéristiques de ces pathologies, tels que l'augmentation du poids corporel, l'augmentation du tissu adipeux, l'hyperglycémie, les cataractes, la présence du glucose dans les urines, la cétonurie et la dégénération des cellules β pancréatiques.(1,279) De plus, les animaux présentent aussi des dyslipidémies, qui toutefois, n'ont pas été bien caractérisées.(1,163) Finalement, l'évolution vers un état diabétique s'accompagne, chez ces animaux, par le développement des diverses complications micro- et macro-angiopathiques. Elles incluent, entre autres, un épaissement des membranes basales des capillaires, des fibroses ischémiques, un épaissement de l'intima accompagné de la présence des cellules spumeuses et de microthrombi.(214,215) Cependant, aucune anomalie métabolique mentionnée ne semble pas survenir chez ces animaux à l'état sauvage ou

chez les animaux en laboratoire soumis à une diète faible en énergie.(1,279,162) Le *Psammomys obesus* est donc un animal chez qui l'atteinte diabétique peut être contrôlée par l'alimentation. Plus exactement, la quantité totale de l'énergie digestible et non la qualité de certaines composantes de leur diète est déterminante. De plus, le *Psammomys obesus* est un animal qui ne démontre pas d'hyperphagie et devient seulement modérément obèse. Ces observations indiquent que l'efficacité du métabolisme de ces animaux est responsable du développement de l'obésité et du diabète.(162)

1.7.2 Développement du diabète chez le *Psammomys obesus*

Chez le *Psammomys obesus*, la transition de l'état normal au diabète a été classée en quatre étapes souvent consécutives, qui définissent l'étendue des anomalies retrouvées: le groupe A est caractérisé par des animaux qui sont normoinsulinémiques/normoglycémiques; le groupe B contient les animaux hyperinsulinémiques/normoglycémiques présentant une accumulation marquée du tissu adipeux et une résistance à l'insuline. Le groupe C regroupe des animaux hyperinsulinémiques/hyperglycémiques qui se caractérisent par une augmentation encore plus prononcée de l'obésité et de l'hyperinsulinémie qui, par ailleurs, n'est plus suffisante pour contrecarrer la résistance à l'insuline et prévenir la gluconéogenèse hépatique.(161) Ces *Psammomys obesus* diabétiques présentent même une corrélation directe entre les niveaux de glycémie à jeun et la production hépatique de glucose, similaire à celle observée dans le diabète humain.(123) Il est intéressant de constater que les animaux des groupes B et C soumis à une restriction énergétique peuvent régresser au stade du groupe A.(381) Finalement le groupe D comporte les animaux hypoinsulinémiques/hyperglycémiques qui se caractérisent par une perte de poids,

accompagnée par une diminution de l'insulinémie, une augmentation importante de la glycémie et une cétonurie.(161) Dans le groupe D l'exposition à une hyperglycémie prolongée et une surstimulation des cellules β pancréatiques a induit l'apoptose de ces dernières. Il en résulte une détérioration des fonctions sécrétrices du pancréas et une diminution de la capacité de sécrétion d'insuline. Ceci explique pourquoi le retour à une alimentation faible en énergie ne peut plus à cette étape faire régresser l'animal à un autre stade.(16,153)

Le développement du diabète chez les *Psammomys obesus* démontre donc plusieurs points communs avec celui retrouvé chez l'humain.

1.7.3 Caractéristiques métaboliques des *Psammomys obesus*

Plusieurs études ont été effectuées afin de déterminer les caractéristiques métaboliques qui prédisposent cet animal au syndrome diabétique dans un environnement d'excès d'énergie.

En comparaison avec les rats albinos, les *Psammomys obesus* présentent des taux très élevés de lipogénèse hépatique, accompagnés par une activité élevée de la LPL adipocytaire et une augmentation de l'utilisation, par le tissu adipeux, des TG provenant des VLDL.(160) De plus, l'activité de la LPL adipocytaire étant très élevée aussi bien en période post-prandiale que dans les conditions de jeûne, l'accumulation des TG dans le tissu adipeux est stimulée de façon constante.(44) Toutes ces caractéristiques peuvent être à la base du développement de l'obésité observée chez les animaux soumis à une diète riche en énergie.

Le *Psammomys obesus* non diabétique possède une densité très faible des récepteurs à l'insuline dans le foie. De plus, le développement graduel de l'hyperinsulinémie, suite à

un régime riche en énergie, s'accompagne d'une diminution de la capacité d'insuline à stimuler le récepteur tyrosine kinase au niveau du foie et du muscle et ce, avant même l'apparition de l'état d'hyperglycémie. Ces altérations de l'activation du récepteur tyrosine kinase sont réversibles par l'alimentation faible en énergie et le retour d'un état normoinsulinémique.(166) Ces résultats suggèrent que l'hyperinsulinémie seule est à l'origine des anomalies observées.

L'incapacité de causer une hypoglycémie marquée par l'administration de l'insuline exogène chez les animaux normoinsulinémiques/normoglycémiques soumis à une diète faible en énergie a soulevé la possibilité que la résistance à l'insuline soit un trait inhérent du *Psammomys obesus*. Il représenterait chez ces animaux une adaptation métabolique à la survie dans les conditions de privation alimentaire. En présence d'un excès d'énergie, ce mécanisme aurait des conséquences délétères.(380) L'observation de la surexpression de l'isoforme ϵ de la protéine kinase C chez ces animaux à l'état non-diabétique est une preuve de plus à l'appui de cette théorie. La surexpression de cet isoforme n'a pas de conséquences métaboliques tant que les animaux sont nourris par une diète faible en calories, toutefois l'introduction d'une diète hautement énergétique s'accompagne d'une augmentation de son activité. Les altérations au niveau de l'expression et de l'activité de cet isoforme semble à leur tour contribuer au développement de la résistance à l'insuline par la diminution du nombre des récepteurs à l'insuline.(147) De plus, la faible capacité d'oxydation du glucose par les îlots pancréatiques des animaux non-diabétiques peut être un autre mécanisme d'adaptation à leur environnement naturel, qui dans conditions de surabondance énergétique devient néfaste.(232) Finalement, les *Psammomys obesus* non-diabétiques démontrent aussi, au niveau du foie, une faible capacité d'oxydation du glucose et une aptitude augmentée

d'oxydation des acides gras. L'état de diabète accentue ces caractéristiques métaboliques.(228) Toutes ces observations suggèrent que l'excès énergétique hausse la susceptibilité de cet animal à la résistance à l'insuline.

1.7.4 Dysfonctions pancréatiques chez le *Psammomys obesus*

L'état de diabète chez le *Psammomys obesus* se caractérise par diverses dysfonctions des cellules β pancréatiques similaires à celles observées dans le diabète de type 2 chez l'humain.

L'hyperproinsulinémie, très bien documentée dans le diabète de type 2 chez l'humain, se retrouve aussi chez Les *Psammomys obesus* diabétiques.(258) Un épuisement important des réserves d'insuline pancréatique accompagne cet état.(108) Les altérations semblent résulter d'une surstimulation des cellules β pancréatiques secondaire à la résistance à l'insuline conduisant à des anomalies dans le métabolisme des granules contenant les molécules de proinsuline.(20) Il en résulterait une sécrétion augmentée de la proinsuline et une diminution de l'insuline pancréatique. Il est très probable que l'hyperglycémie qui en résulte exacerbe à son tour ces altérations en augmentant la demande de sécrétion d'insuline. En effet, il est très intéressant de constater qu'une courte période de jeûne (16-20 h) ou le retour à l'alimentation faible en énergie restaurent, en partie, les réserves d'insuline pancréatique et le ratio proinsuline/insuline. Cette réversibilité démontre l'importance de l'alimentation dans le développement de ces anomalies.(108)

Certains effets adverses de l'hyperglycémie sur la fonction pancréatique, semblent aussi être présents chez le *Psammomys obesus*. En effet, l'hyperglycémie prolongée réduit la capacité proliférative des cellules β pancréatiques et augmente le taux de la mort cellulaire. La diminution de la masse des cellules β pancréatiques qui en résulte entrave

une réponse compensatoire normale.(81) Par contre, les îlots pancréatiques des animaux diabétiques présentent une diminution du seuil glycémique nécessaire à la sécrétion d'insuline, accompagnée par une capacité augmentée de phosphorylation du glucose, ce qui constitue un autre mécanisme compensatoire de la sécrétion insulinaire.(231) Par ailleurs, les anomalies au niveau de la fonction pancréatique, observées chez le *Psammomys obesus* au cours des études *in vivo*, ont pu être reproduites *in vitro* en exposant les îlots pancréatiques de ces animaux à des concentrations élevées de glucose.(193) Ces observations suggèrent que l'hyperglycémie seule peut être à l'origine de ces altérations pancréatiques. De plus, ces résultats impliquent que la glucotoxicité chez ces animaux est un facteur pathologique aussi important que chez l'humain.(193,153)

1.7.5 Avantage des *Psammomys obesus*

Le *Psammomys obesus* est un animal qui représente les effets de l'abondance nutritionnelle qui caractérise notre société. Le métabolisme de cet animal est très bien adapté à un environnement bas en énergie.(162) Le développement du diabète chez lui n'est pas prédéterminé, mais dépend de la valeur énergétique de son alimentation. En effet, l'exposition à une diète riche en énergie fait ressortir chez cet animal le phénotype diabétique qui se traduit par le développement graduel de l'obésité, la résistance à l'insuline, l'hyperglycémie, et des diverses anomalies qui les accompagnent.(163) La restriction énergétique chez le *Psammomys obesus* induit, quant à elle, une réduction de la glycémie, de l'insulinémie et de l'hyperlipidémie associée au diabète.(14) Dans ce contexte, le *Psammomys obesus* représente un modèle de développement du syndrome de "diaobésité" similaire à celui retrouvé chez les humains.(163)

En bref, le *Psammomys obesus* est un modèle pertinent pour étudier divers aspects relatifs au développement de l'obésité, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2, tels que la relation entre la nutrition et la génétique dans la pathogenèse, le traitement nutritionnel, la contribution des dysfonctions pancréatiques, les dyslipidémies, et etc. De plus, la transition graduelle menant au diabète permet d'investiguer l'apparition progressive des diverses anomalies et de définir leur origine exacte. Le *Psammomys obesus* semble donc un modèle adéquat pour étudier et comprendre un autre aspect très important et encore peu connu de la pathophysiologie de l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète, c'est à dire les désordres du métabolisme des lipides et des lipoprotéines.

Figure 15: Le *Psammomys obesus*



Fig. 15 : Le *Psammomys obesus* est une gerboise vivant dans les régions désertiques d'Afrique du Nord et de la Méditerranée orientale. La captivité et l'exposition à une diète de laboratoire font ressortir, chez cet animal, le phénotype diabétique typiquement humain.

1.8. Buts et hypothèses de travail

L'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 sont tous des désordres interreliés. De surcroît, ils sont associés à de nombreuses anomalies métaboliques qui jouent un rôle primordial dans la genèse des maladies athérosclérotiques. Néanmoins, l'apport intrinsèque de chaque composante avant et après l'installation de l'hyperglycémie demeure extrêmement mal défini. Les objectifs majeurs de notre projet consistent donc à déterminer leurs répercussions individuelles sur un aspect encore très peu connu: le métabolisme périphérique et hépatique des lipides. Par ces études, nous espérons établir les événements métaboliques caractéristiques du développement de dyslipidémie athérogène et d'étudier leur progression dans les états de résistance à l'insuline et de diabète. Nous pensons que l'obésité et la résistance à l'insuline sont déjà accompagnées par des multiples altérations lipidiques qui ne font que s'aggraver au cours du développement de l'hyperglycémie. Si tel est le cas, leur identification est à la base de la prévention et du traitement des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques. D'autre part, nos recherches s'effectueront dans un modèle animal, le *Psammomys obesus*. Comme nous l'avons souligné auparavant, nous pensons que ce dernier représente un excellent modèle du développement et d'évolution de diabète de type 2, tel qu'observé chez l'humain.

Notre étude débutera par la caractérisation des animaux afin de définir les 3 groupes qui nous intéressent, c'est à dire, le groupe des témoins, le groupe des animaux obèses et résistants à l'insuline et le groupe des diabétiques. Une fois cette étape terminée, nous documenterons le profil des lipides sanguins et examinerons la composition des lipoprotéines circulantes dans les trois groupes d'animaux. En parallèle,

compte tenu du rôle central du foie dans l'homéostasie lipidique, nous nous proposons d'investiguer son implication dans les aberrations lipidiques. Nous insisterons particulièrement sur le carrefour métabolique du cholestérol hépatique, en analysant l'activité des enzymes clés impliquées dans sa régulation. Pour compléter ce volet d'études, nous étudierons le statut lipidique au niveau du foie, ce dernier constituant le site majeur de la lipogénèse et la production des lipoprotéines. Nous ferons aussi le tour de l'intestin, un autre centre de l'élaboration des lipoprotéines.

La glycosylation non enzymatique des protéines est un phénomène souvent observé dans le diabète de type 2. Par ailleurs, la glucosylation des LDL se révèle des plus délétères, compte tenu de son implication dans l'initiation et la progression des événements athérosclérotiques. Dans notre modèle animal, nous étudierons la présence des LDL glucosylées, et définirons leurs modifications qualitatives. Par la suite, nous nous proposons de déterminer les effets de la glucosylation des LDL sur l'agrégation plaquettaire, la chimotaxie des monocytes et l'estérification du cholestérol par les macrophages, tous étant des facteurs proathérogènes. Ces travaux nous aideront à déterminer la contribution de la glucosylation aux désordres cardiovasculaires.

Finalement, le dysfonctionnement vasculaire se retrouvant parmi les phénomènes initiaux dans le développement de l'athérosclérose, nous en vérifierons la présence dans notre modèle animal et déterminerons son évolution dans les états de résistance à l'insuline et du diabète, le tout en rapport avec les anomalies lipidiques.

Nous espérons que ces travaux nous permettront de documenter et de proposer un schéma complet de voies métaboliques lipidiques altérées dans la résistance à l'insuline et le diabète.

Finalement, la majorité des études présentées dans cet ouvrage a été effectuée dans notre laboratoire. J'ai grandement contribué à leur réalisation aussi bien au niveau des manipulations, leur mise au point et leur exécution, ainsi qu'à la rédaction des articles. Les recherches accomplies requérant l'emploi des diverses approches scientifiques, la contribution des co-auteurs des articles a été indispensable.

Mon directeur de recherche, Dr Émile Lévy et mon co-directeur, Dr Edgard Delvin ont continuellement apporté leur connaissance et leur aide dans le déroulement des toutes les recherches effectuées et dans la rédaction des articles.

Nous avons beaucoup collaboré avec le groupe de recherche d'Israël, les Dr E. Ziv, Dr R. Kalman et Dr H. Bar-On. Leur participation a été décisive dans nos recherches. Ils nous ont fourni les animaux utilisés dans nos études, et leur connaissance sur ce modèle animal a été essentielle à la réalisation de ces études.

Le Dr Jean St- Louis et M. Benoît Sicotte du Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine nous ont énormément aidé dans la réalisation des travaux sur la contraction vasculaire grâce à leur savoir technique et théorique du sujet.

2. Article 1

Article publié dans Atherosclerosis 157 (2001) 85-96

**CIRCULATING LIPOPROTEINS AND HEPATIC STEROL
METABOLISM IN *PSAMMOMYS OBESUS* PRONE TO OBESITY,
HYPERGLYCEMIA AND HYPERINSULINEMIA**

**Monika Zoltowska¹, Ehud Ziv², Edgard Delvin¹, Simona Stan¹, Hanoch Bar-On²,
Ronny Kalman² and Emile Levy¹**

¹Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine
Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada
and

²Diabetes Unit, Division of Internal Medicine
Hadassah University Hospital
Jerusalem, Israel

Running title: Plasma and hepatic lipid abnormalities in *Psammomys obesus*

Keywords: Diabetes, insulin resistance, liver, ACAT, HMG-CoA reductase, 7 α -hydroxylase

Address for correspondence: Dr. Emile Levy
GI-Nutrition Unit
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec H3T 1C5
Tel.: (514) 345-4626
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

The liver plays a central role in lipoprotein metabolism and cholesterol homeostasis. As the physiopathology of lipid disorders in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) is multifactorial and still imperfectly known, we evaluated its onset on lipid transport and hepatic cholesterol metabolism in *Psammomys obesus*. This sand rat lapses into hyperinsulinemia and hyperglycemia when transferred from its native food to laboratory rodent diets. Marked hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia developed in hyperinsulinemic (Group B) and hyperglycemic/hyperinsulinemic (Group C), compared with normal *Psammomys obesus* (Group A). Group B showed significantly ($p < 0.05$) higher plasma VLDL-cholesterol (41.9%) and LDL-cholesterol (47.3%) concentrations, whereas Group C was characterized by an even more marked increase in VLDL cholesterol (176%, $p < 0.001$) compared with group A. Lipoprotein composition was also altered, displaying impaired lipid and apolipoprotein moiety distribution in IDL, LDL, HDL₂ and HDL₃ lipoprotein fractions of Groups B and C. The activity of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis, was consistently lower in Group B ($p < 63.4\%$, $p < 0.001$) and C (43.9%, $p < 0.005$). In contrast, the direct measurement of microsomal acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT), controlling the acylation of cholesterol, showed an increase averaging 53% in Group B ($p < 0.01$) and 61% in Group C ($p < 0.005$). Similarly, elevated activity (171.1%, $p < 0.05$ and 291.4%, $p < 0.001$, respectively) was related to cholesterol 7 α -hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis. These alterations were accompanied with abundant deposition of triglycerides and cholesterol in the liver. Changes in circulating lipids and

liver parameters were related to glucose and insulin levels, indicating the implication of insulin resistance and diabetes. Therefore, our findings demonstrate various disturbances in plasma lipid profile and lipoprotein composition, as well as in liver cholesterol metabolism during the sequential development of insulin resistance and diabetes in *Psammomys obesus* rats. Furthermore, the current data point to an undoubtedly role of the liver in the pathogenesis of metabolic disorders in the progression of nutritionally induced insulin resistance and diabetes in the *Psammomys obesus*. Finally, current research shows that insulin resistance may result in more marked plasma and hepatic lipid perturbations than the diabetes condition.

INTRODUCTION

Obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia occur in a high proportion of *Psammomys obesus* sand rats, when transferred from their native food in desert regions to laboratory rodent diets¹⁻⁴. Genetic factors predispose *Psammomys obesus* to non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), whereas environmental, mainly nutritional, factors contribute to the development of the diabetic syndrome. The progression of nutritionally induced diabetes in the *Psammomys obesus* in many respects resembles the development of insulin resistance and NIDDM in certain human populations such as Pima Indians, Australian Aborigines and Asian Indians⁵⁻⁷. The predisposed sand rats disclose a wide range of severity and possible transition to Type 1 diabetes^{8,9}. They are divided into 4 groups, according to plasma glucose and insulin levels. By reference to normoglycemic and normoinsulinemic *Psammomys* (Group A), a high proportion of animals display hyperinsulinemia (Group B), which appears to compensate for both peripheral and hepatic insulin resistance as evident from the persistence of normoglycemia. In Group C, the glycemia is no longer compensable in spite of the extraordinary elevation in plasma insulin, while in Group D, there is no capacity to react to hyperglycemia with increased insulin secretion. Thus, the *Psammomys obesus* rat represents a powerful tool to follow the effects of nutritional abundance or affluent nutrition in the time-course of various metabolic changes during the development of insulin resistance and diabetes. It is also preferable to streptozotocin diabetic rats that are considerably useful in the learning and understanding metabolic derangements of Type 1 diabetes, but less effective in representing Type 2 diabetes.

Numerous qualitative and quantitative lipoprotein abnormalities are commonly observed in both groups of human subjects with poorly controlled IDDM and NIDDM¹⁰. These lipoprotein disturbances obviously contribute to the acceleration of atherogenesis, which remains the most important cause of morbidity and mortality in long-standing diabetes¹¹. It becomes evident that the effects of a diabetic state may interact with several other abnormalities, such as hypertension, smoking, drug therapy, diet, hypothyroidism, alcohol excess, nephrosis, and other causes¹⁰⁻¹². In addition, diabetes in humans is often the aggravating factor of a preexisting lipid disorder from independently inherited disorders of lipoprotein metabolism¹⁰⁻¹². Furthermore, even if two types of diabetes (IDDM and NIDDM) emerge from most of the scientific reports, many distinct and intermediary diabetic syndromes are now recognized^{13,14}. All these complex factors may coexist in the patient and cloud the direct effects of diabetes on lipoprotein metabolism. The use of the sand rat model precludes the aforementioned disadvantages and facilitates control studies on lipid profile and lipoprotein composition during the development of insulin resistance and diabetes. Surprisingly, no such studies have been performed employing this animal model.

The liver obviously plays a central role in cholesterol homeostasis¹⁵. It constitutes the major site of lipogenesis and lipoprotein production¹⁶⁻¹⁸. In the hepatic parenchymal cells, cholesterol is converted into bile acids, and the biliary secretion of cholesterol, either in unchanged form or as bile acids, represents the main physiological route of net cholesterol elimination from the body^{19,20}. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism are found to be markedly altered in chemically-induced diabetes^{21,22}. Alloxan-diabetic mice develop a marked increase in liver and bile sterols (21). Similarly, after administering streptozotocin treatment to rats, hepatobiliary changes have been

noted and were accompanied with a transient hepatotoxic effect²². It is not clear whether these impairments are due to diabetes itself or to the toxicity of the drug, given that these alterations are often not completely reversible by means of insulin treatment in insulin-dependent diabetes²³⁻²⁶. Using sand rats prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia, our investigation will attempt to answer the following questions: 1) How does the onset of diabetes alter plasma lipid profile and lipoprotein composition? 2) Is hepatic HMG-CoA reductase, the rate limiting enzyme that regulates the biosynthesis of cholesterol, impaired during certain stages of diabetes onset? 3) Do insulin resistance and diabetes affect microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase, the rate-limiting step of bile acid synthesis? 4) Can the development stages of insulin resistance-diabetes syndrome modify ACAT activity, which has been linked to the maintenance of hepatic intracellular cholesterol homeostasis? 5) Is there a direct correlation between plasma insulin/glucose levels and lipid disturbances?

MATERIALS AND METHODS

Animals and diet

Sand rats (*Psammomys obesus*) of the Hebrew University, Hadassah Medical School Animal Farm, strain were used. Upon weaning at 3 weeks of age, the animals were maintained on a chow diet (Amrod 935, Hedera, Israel). Details of the food composition, breeding and maintenance have been previously reported ²⁷. Food and water were given *ad libitum*. The *Psammomys* were housed in a temperature controlled room with a 12-12h light-dark cycle. Female sand rats aged 14-18 wk were sacrificed for the following experiments. Animals were distributed into the different groups after the biochemical characterization of the blood samples. All experimental procedures were authorized by the Institutional Animal Care Committee.

Isolation of lipoproteins

Blood samples were collected in tubes containing 1 mg EDTA/ml and were separated immediately by low speed centrifugation (2,500 rpm, 20 min) at 4°C. Lipoproteins were isolated from fresh plasma by conventional discontinuous density gradient ultracentrifugation as previously described ^{28,29}. Briefly, after preliminary centrifugation to remove chylomicrons (25,000 rpm for 30 min) in a Beckman L5-65 preparative ultracentrifuge using a Ti-50 rotor, very low density (VLDL), intermediate density (IDL), and low density (LDL) lipoproteins were isolated at densities of 1.006 g/ml, 1.019 g/ml, and 1.063 g/ml, respectively, at 40,000 rpm for 18 h at 5°C. The separation of high density lipoprotein (HDL) subpopulations was performed at 40,000 rpm for 48 h at the following densities: 1.125 g/ml for HDL₂ and 1.21 g/ml for HDL₃.

The lipoprotein fractions were dialyzed intensively against 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, pH 7.0 before their chemical characterization.

Lipid and lipoprotein analysis

Plasma concentrations of total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), and triglycerides (TG) were measured enzymatically by a commercial kit (Boehringer Mannheim, Montreal) as reported previously^{28,29}. Cholesteryl ester (CE) levels were calculated as the difference between total and unesterified cholesterol x 1.7. Lipoprotein-protein (PR) was quantified according to Lowry et al³⁰ with bovine serum albumin as a standard. Phospholipids (PL) were determined by the Bartlett method³¹. Apolipoprotein content of plasma lipoproteins was qualitatively assayed using SDS polyacrylamide gel electrophoresis^{28,29}. The gels were stained for 1 h with Coomassie blue and destained in 7% acetic acid. The bands for apolipoproteins were identified by comparison with the mobility of apolipoprotein standards and by standards of different molecular weights.

Preparation of liver microsomes

Rats were killed at 9 AM, the diurnal high point of HMG-CoA reductase activity²⁸. The livers were removed and placed in ice-cold buffer (pH 7.4) containing 250 mmol/L of sucrose, 50 mmol/L of Hepes, 1 mmol/L of ethylenediaminetetraacetic acid, 50 mmol/L of sodium fluoride, 5 mmol/L of glutathion, and 20 mmol/L of dithiolthreitol. Livers were excised, rinsed, homogenized, and submitted to centrifugation for 20 minutes at 12,000 g at 4°C. The supernatant fraction was then centrifuged for 60 minutes at 100,000 g. The pellet was resuspended in the above buffer

and resedimented at 100,000 g for 60 minutes at 4°C. The washed microsomal pellets were quick-frozen and stored at -80°C before use.

Assay of microsomal HMG-CoA reductase activity.

Microsomal enzymatic activity was assayed as described previously ²⁹. The reaction mixture contained 100 mmol/L potassium phosphate (pH 7.4), 300 µg of microsomal protein, 20 mmol/L of glucose-6-phosphate, 2.5 mmol/L of nicotinamide-acenine dinucleotide phosphate, 12.5 mmol/L of dithiothreitol and 1.2 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase. The reaction was initiated by the addition of [13-¹⁴C]HMG-CoA (15,000 dpm/nmol). After incubation for 30 minutes at 37°C, the [¹⁴C]mevalonate formed was converted into lactone, isolated by thin-layer chromatography ³², and counted using an internal standard to correct for incomplete recovery. HMG-CoA reductase activity was expressed as nanomoles of mevalonate synthesized per milligram of protein per minute.

Microsomal ACAT activity

The standard ACAT determination was based on the assay of Erickson et al ³⁴ as described previously ³³. To the assay mixture containing 150 µg microsomal protein were added 5 µmol [¹⁴C]oleoyl coenzyme A (specific activity ~ 10,000 dpm/µmol) to initiate the reaction in a buffer solution (pH 7.5) consisting of 0.1 mol/L of Tris-HCl, 0.25 mol/L of sucrose, and 1 mmol/L of ethylenediaminetetracetic acid. After incubation for 10 minutes at 37°C, the reaction was stopped by adding chloroform/methanol (2:1, vol/vol) followed by [³H]cholesteryl oleate as an internal standard to estimate recovery.

Determination of microsomal 7 α -hydroxylase activity

Hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase was measured as described previously³³. Incubations contained 400 μ g of microsomal protein, 1 mmol/L of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, 10 mmol/L of glucose-6-phosphate, and 0.15 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase. β -mercaptoethylamine (10 mmol/L) was included to minimize nonenzymatic oxidation of cholesterol. The reaction was initiated by a suspension of [¹⁴C]cholesterol (80,000 dpm/nmol cholesterol) in lecithine liposomes. The reaction was terminated after a 15-minute incubation at 37°C by adding chloroform-methanol (2:1, vol/vol). The reactive products were extracted and separated on thin-layer chromatography with 7 α -hydroxycholesterol as an internal standard. Plates were developed in benzene/ethyl acetate (2:3).

Statistical analysis

All values were expressed as the mean \pm SEM. Data were statistically analyzed by multivariate ANOVA and Student's two sided t test.

RESULTS

Physical and Biochemical Characteristics

The susceptibility of the desert gerbil *Psammomys obesus* to a high energy diet results in insulin resistance and diabetes. While no hyperglycemia or hyperinsulinemia is detected in control animals, a marked hyperinsulinemia (~ 11-fold control values, $p < 0.001$) develops without hyperglycemia in predisposed animals of Group B, which exhibits body weight gain (Table 1). As reported previously, the insulin resistance in this hyperinsulinemic group is an inherent feature in *Psammomys obesus*^{6,35}. Exorbitant hyperinsulinemia (~ 14-fold control values, $p < 0.001$), severe hyperglycemia (5-fold, $p < 0.001$) and elevated body weight (34%, $p < 0.001$) characterized the diabetic Group C. Part of this body weight gain could be explained in part by increases in adipose tissue and liver mass.

Plasma Lipid and Lipoprotein Concentrations

Although both groups of insulin resistance and diabetes demonstrated abnormal values for plasma lipids and lipoproteins, compared with controls, the diabetic Group C was more severely affected (Fig. 1). Triglyceride and cholesterol levels were higher in insulin-resistant Group B, but the increase was more pronounced in diabetic *Psammomys obesus* of Group C. The hypercholesterolemia was closely associated with free and esterified cholesterol. However, free cholesterol was particularly higher in the diabetic Group C animals. As expected from these lipid abnormalities, changes were also recorded in the lipoprotein fractions (Fig. 2). While HDL-cholesterol was only marginally higher in the diabetic Group C, a substantial increase was noted in VLDL-

cholesterol and LDL-cholesterol concentrations. The semiquantitative agarose gel electrophoresis corroborated these data, in view of the excessive proportion of pre- β and β -lipoprotein illustrated (Fig. 3).

Plasma Lipoprotein Composition

The composition of the lipoprotein classes obtained with sequential ultracentrifugation is reported in Table 2. While no significant differences were noted in VLDL composition among groups, an evident enrichment in CE was observed in the IDL fraction of insulin resistant Group B and diabetic Group C animals. The LDL fractions of these same animals were TG-depleted and CE-enriched. Furthermore, other alterations were observed in PL and PR in LDL of Group C. Similarly, only diabetic animals displayed changes in their HDL subfraction composition: an increase in PL and a decrease in PR were detected in HDL₂, and a higher proportion of PL characterized the HDL₃ particles. As shown in Table 2, the resulting calculated values of various lipid ratios were found to be impaired in the *Psammomys* of Groups B and C. Not only did these persistent ratio values validate the abnormal lipoprotein composition in Groups B and C, but they also point out the differences in size of lipoprotein particles. For example, the high mass ratio of core constituents (TG+CE) to surface constituents (FC+PL+PR) in Group C suggests larger HDL₂ particles. Apolipoprotein distribution was evaluated by the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 4). The VLDL preparations varied slightly in their apolipoprotein patterns. The VLDL derived from Group B revealed an increase in apo B-100 and apo E, whereas a lower proportion of apo C was evident in the VLDL of Group C. While no major differences were noted in the IDL fraction except for a reduced proportion of apos E and C in Group

C, markedly increased proportions of apos B, E and C were observed in the LDL fraction of Group B. Finally, the apolipoprotein composition in HDL subfractions was not divergent among the three groups.

Hepatic Lipid Content

Significant differences in liver lipid content were observed among the three groups of *Psammomys obesus* (Fig. 5). Though hepatic triglyceride and total cholesterol concentrations were higher in Groups B and C, the pattern of increase was more obvious for Group B animals. Thus, the significant rise of B and C compared with controls, was 629% and 210% for TG, respectively, and 149% and 123% for total cholesterol, respectively. Raised levels of both free and esterified cholesterol components, were noted in Groups B and C, although they showed a different pattern of distribution. Free cholesterol was more elevated in Group C, whereas esterified cholesterol was dominant in Group B.

Microsomal Sterol Enzymes in the Liver

Since HMG-CoA reductase, ACAT and cholesterol 7 α -hydroxylase have been linked to the maintenance of hepatic cholesterol homeostasis, it was important to determine their activity in the liver of the three groups of *Psammomys obesus*. Their activity measurement on fractionated microsomes revealed marked differences (Fig. 6). While HMG-CoA reductase activity significantly ($p < 0.001$) decreased in microsomes of insulin resistant and diabetic (3.1 and 1.9-fold, respectively) animals, ACAT activity significantly ($p < 0.005$) increased in insulin resistant (~45%) and diabetic *Psammomys*

obesus (~ 47%). A similar trend was noted in cholesterol 7 α -hydroxylase, disclosing an enhancement in insulin resistant (171%) and diabetic (291%) animals.

Correlations between liver mass and biochemical parameters

Circulating lipids and liver mass were plotted as a function of plasma insulin and glucose levels. A positive correlation was obtained between the latter and plasma triglycerides, cholesterol and liver weights (Fig. 7). Furthermore, the strong relationship between circulating lipids and liver weights (Fig. 8) emphasized the role of the liver in plasma lipid metabolism.

DISCUSSION

Numerous investigators have focused on *Psammomys obesus* because it represents a useful experimental model for human nutrition-induced NIDDM, the so-called "diabesity" syndrome. Even though various studies have provided interesting information on insulin processing³⁵⁻³⁸, nutritional aspects³⁹⁻⁴² and glucose metabolism^{43,44} in *Psammomys obesus*, very little is known about hepatic lipid handling, transport and lipoprotein metabolism. One thing is clear, however, the derangement of hepatic lipid fat homeostasis along with diabetic dyslipidemia contribute substantially to the occurrence of cardiovascular disease, especially in association with a "Westernized lifestyle" (sedendarity and energy dense diet)⁴⁵. Therefore, the aim of this study was to evaluate lipid profile, lipoprotein composition and liver fat status, as well as hepatic cholesterol metabolism in the three characterized groups of *Psammomys obesus*. In addition to confirming the role of the relatively high caloric diet in the development of hyperinsulinemia, obesity and ultimately NIDDM, our results demonstrated marked lipid and lipoprotein abnormalities with the sequential transition of animals from normal insulin sensitivity to impaired insulin sensitivity. First, hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia developed in the hyperinsulinemic group, but were more severe in the hyperglycemic/hyperinsulinemic group. Second, hypercholesterolemia was accompanied with an increase in VLDL- and LDL-cholesterol, while HDL-cholesterol remained unchanged in both groups. Third, impaired lipoprotein composition, especially that of HDL subfractions, characterized the hyperglycemic/hyperinsulinemic group. Fourth, in contrast to circulating lipids, hepatic concentrations of triglyceride and cholesterol were higher in the hyperinsulinemic than hyperglycemic/hyperinsulinemic

group. Fifth, significant alterations were detected in the three key enzymes controlling hepatic cholesterol homeostasis. Finally, calculated correlations of insulin with circulating and hepatic lipids underlined the role of the liver and the exacerbation of the anomalies in the hyperglycemic/hyperinsulinemic group.

Hypertriglyceridemia frequently occurs in individuals with insulin resistance and in patients with Type 2 diabetes ¹⁰. Among the major factors known to influence the levels of triglyceride-rich lipoproteins are liver secretion and peripheral lipoprotein lipase (LPL)-mediated catabolism. Active hepatic lipogenesis associated with abundant lipogenic activity in the liver of hyperglycemic or hyperglycemic/hyperinsulinemic *Psammomys obesus* was documented in our previous report ⁸. Similarly, from data published beforehand, LPL reached a maximal activity with the emergence of insulin resistance and did not decrease below control values in hyperinsulinemic/hyperglycemic Group C⁴. Thus, the hypertriglyceridemic state observed in Groups B and C, in the face of these early findings, should be regarded as a result of dominant hepatic lipogenesis rather than a sluggish peripheral clearance. This is well emphasized by the direct relationship between insulin and liver weight as well as between liver weight and plasma triglycerides. Our previous data documented peripheral and hepatic insulin resistance, which characterized states B and C ^{8,9}. In addition, evidence of low insulin receptor in muscle and liver and decreased receptor function in association with hyperinsulinemia developing on high energy diets (relative to its native nutritional regimen) were demonstrated ³⁵. Insulin-induced receptor activation, a prerequisite for intracellular signal transduction was inhibited in the hyperinsulinemic-hyperglycemic state, indicating that the resistance is located at the receptor site³⁵.

The various clustering alterations found in Type 2 diabetic, insulin resistant patients could act in interaction with hyperglycemia to further increase coronary heart disease. Not only did *Psammomys obesus* of hyperinsulinemic Group B and hyperglycemic/hyperinsulinemic Group C present hypertriglyceridemia, but they also manifested hypercholesterolemia, as reflected by increased concentrations of VLDL-cholesterol and LDL-cholesterol. This hyperlipidemic condition subsequent to enhanced lipoprotein secretion by the liver may contribute to vascular complications described by Marquié et al ^{46,47}. Indeed, the progression of diabetes in *Psammomys obesus* was accompanied with the development of generalized microangiopathy and macroangiopathy, including capillary basement membrane thickening, ischaemic fibrosis, thickening of the intima, deposition of glycosaminoglycans, the presence of foam cells in the intima and microthrombi ^{46,47}. Even if the sand rat generally behaves like the laboratory rat, which is resistant to both spontaneous and induced atherosclerosis ⁴⁸, the occurrence of insulin resistance and diabetes is related to vascular manifestations. For example, the enrichment of the intima and media in glycosaaminoglycans ⁴⁷, can facilitate lipoprotein invasion ⁴⁹. Therefore, increased VLDL and LDL, illustrated by the current study, may penetrate through the wall, and be taken up and retained by glycosaaminoglycans.

Liver HMG-CoA reductase is a smooth endoplasmic reticulum transmembrane glycoprotein, which regulates the biosynthesis of cholesterol. Some studies in streptozotocin-induced diabetes showed a marked decrease ⁵⁰, while others reported normal or even increased values ⁵¹ of HMG-CoA reductase activity ⁵². Not only has this important issue not been resolved, but the very often used streptozotocin model introduces numerous limitations on the interpretation of the information obtained. The

pathogenic process that initially seemed simple, i.e. destruction of pancreatic β -cells by streptozotocin, is revealed as remarkably complex, as more information accumulates through different lines of experimentation. At high doses, severe insulin deficiency is caused and ketoacidosis results and, at lower doses, hyperglycemia is mild and stable⁵³. Our work attempted to identify the sequential appearance of HMG-CoA reductase activity during dietary-induced impaired glucose tolerance and chronic hyperinsulinemia/hyperglycemia in *Psammomys obesus*. Although both abnormal conditions affected the enzyme activity, a more severe decline characterized the hyperinsulinemic state.

The role of hepatic ACAT in insulin resistance, obesity and diabetes has not been defined. However, a reduction in hepatic ACAT activity in chemically-induced diabetes has been reported^{54,55}, suggesting limited hepatic cholesterol storage esterification in poorly controlled diabetes. In our study, higher levels of ACAT activity were recorded in hyperglycemic Group B and hyperglycemic/hyperinsulinemic Group C, which may have a considerable impact on lipoprotein elaboration and hepatic cholesterol storage.

7α -hydroxylation of hepatic cholesterol is the reaction considered to be the first-rate limiting step in the pathway of bile acid synthesis⁵⁶. Despite the physiological importance of cholesterol 7α -hydroxylase, it is still difficult to evaluate its pattern in diabetes in a satisfactory manner, since divergent results have been reported^{23,57,58}. Our data showed that enhanced hepatic cholesterol 7α -hydroxylase was associated with hyperinsulinemia in *Psammomys obesus*. The onset of hyperglycemia further stimulated its activity. Since the most important physiological signal for the regulation of cholesterol 7α -hydroxylase is considered to be exerted through the enterohepatic

circulation of bile acids ⁵⁸, it will be interesting to examine whether insulin resistance and Type 2 diabetes influence the enzyme activity by a similar mechanism.

In conjunction with the development of hyperglycemia, progressive physical defects have been observed in our work, including hyperinsulinemia, hyperglyceridemia, hypercholesterolemia and obesity. The maintenance of normal glycemia in Group B, in the face of pronounced insulin resistance ^{8,9,59} is probably a consequence of compensatory hyperinsulinemia. Under such conditions, various lipid abnormalities were evident and emphasized the importance of the hyperinsulinemia state prior to the onset of NIDDM. With disease progression, there was a relative worsening in hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia, as illustrated by the apparent correlations in Figures 7 and 8. We might, therefore, view hyperinsulinemia and insulin resistance as dynamic determinants in metabolic lipid impairments, which culminate in further dramatic derangements in NIDDM. Noteworthy is, however, the severity of some lipid disorders before the transition to NIDDM. In fact, plasma LDL-cholesterol, liver lipids (triglycerides, total cholesterol, cholesteryl ester) and HMG-CoA reductase activity were all more impaired in the hyperinsulinemic Group B than in the hyperglycemic/hyperinsulinemic Group C. The physiology behind these crucial observations needs further exploration.

Our data also indicated significantly positive correlations between liver weight and ambient plasma concentrations of insulin, glucose and circulating lipids. Hepatic contributions through the amplification of insulin resistance, obesity and diabetes may be detrimental to lipid metabolism. A number of studies have already provided

compelling evidence that the liver is among the major insulin-sensitive organs in glucose homeostasis ⁶⁰ and likely in lipid balance in other animal models.

In conclusion, our studies have demonstrated that uncontrolled insulin resistance and diabetes disturb the pathways regulating plasma and hepatic sterol homeostasis. The animal model chosen is particularly well suited to underscore the liver sterol characteristics of a population in transition from a healthy state through obesity/insulin resistance and eventually diabetes under controlled conditions, and in the absence of other confounding factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Danielle St-Cyr Huot for typing the manuscript. This work was supported by the Canadian Diabetes Association, Association du Diabète du Québec and the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

1. Schmidt-Nielsen K, Haines HB, Hackel DB. Diabetes mellitus in the sand rat induced by standard laboratory diets. *Science* 1964;164:489-490.
2. Shafrir E. Animal models of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1992;8:179-208.
3. Shafrir E, Gutman A. *Psammomys obesus* of the Jerusalem colony: a model for nutritionally induced non-insulin-dependent diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1993;4:83-99.
4. Ziv E, Shafrir E: *Psammomys obesus*: nutritionally induced NIDDM-like syndrome on a "thrifty gene" background. In: Shafrir E, ed. *Lessons from animal diabetes*. Volume 5. London: Smith-Gordon, 1995;285-300.
5. Swinburn BA, Boyce VL, Bergman RN, Howard BV, Bogardus C. Deterioration in carbohydrate metabolism and lipoprotein changes induced by modern, high fat diet in Pima Indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:156-165.
6. Zimmet P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes — an epidemiological overview. *Diabetologia* 1982;22:399-411.
7. O'Dea K, Traianedes K, Hopper JL, Larkins RG. Impaired glucose tolerance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in Australian Aborigines from the desert. *Diabetes Care* 1988;11:23-29.

8. Kalderon B, Adler JH, Levy E, Gutman A. Lipogenesis in the sand rat (*Psammomys obesus*). Am J Physiol 1983;244:E480-E486.
9. Kalderon B, Gutman A, Levy E, Shafrir E, Adler JH. Characterization of stages in development of obesity-diabetes syndrome in sand rat (*Psammomys obesus*). Diabetes 1986;35:717-724.
10. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. Diabetes Care 1991;14:839-855.
11. Betteridge DJ. Diabetes, lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Br Med Bull 1989;45:285-311.
12. Lopes-Virella MF, Colwell JA. Pharmacological treatment of lipid disorders in diabetes mellitus. Diabetes/Metabolism 1987;3:691-722.
13. Mordes JP, Rossini AA: Animal models of diabetic states. In: Marble A, Krall LP, Bradley RF, Christlieb AR, Soeldner JS, eds. Joslin's Diabetes Mellitus. Twelfth edition 1985;110-137.
14. Shafrir E: Diabetes in animals. In: Rifkin H, Porte D Jr, eds. Diabetes Mellitus, theory and practice. Fourth edition. 1990;299-340
15. Kroon PA, Powell EE. Liver, lipoproteins and disease. I. Biochemistry of lipoprotein metabolism. J Gastroenterol Hepatol 1992;7:214-224.
16. Marzolo MP, Rigotti A, Nervi F. Secretion of biliary lipids from the hepatocyte. Hepatology 1990;12:134S-142S.

17. Havel RJ, Hamilton RL. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* 1998;8:1689-1704.
18. Cooper AD. Role of the liver in the degradation of lipoproteins. *Gastroenterology* 1985;88:192-205.
19. Turley SD, Dietschy JM: The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. In: Arias IM, Jacoby H, Popper D, Schachter D, Schafritz DA, eds. *The liver: biology and pathology*. New York: Raven, 1988;617-641.
20. Packard CJ, Shepherd J. The hepatobiliary axis and lipoprotein metabolism: effects of bile acid sequestrants and ileal bypass surgery. *J Lipid Res* 1982;23:1081-1099.
21. Ishikawa Y, Uchida K. Increased biliary cholesterol secretion in alloxan diabetic mice. *Jpn J Surg* 1984;14:174-184.
22. Carnovale CE, Rodriguez-Garay EA. Reversible impairment of hepatobiliary function induced by streptozotocin in the rat. *Experientia* 1984;40:248-250.
23. Uchida K, Takase H, Kadowaki M, Nomura Y, Matsubara T, Takeuchi N. Altered bile acid metabolism in alloxan diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 1979;29:553-562.
24. Carnovale CE, Marinelli RA, Rodriguez-Garay EA. Toxic effect of streptozotocin on the biliary secretion of nicotinamide-treated rats. *Toxicol Lett* 1987;36:259-265.

25. Marin JJG, Villanueva GR, Esteller A. Diabetes-induced cholestasis in the rat. Possible role of hyperglycemia and hypoinsulinemia. *Hepatology* 1988;8:332-340.
26. Siegers CP, Loeser W, Younes M. Biliary excretion of acetoaminophen in diabetic and hyperthyroid rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985;47:345-365.
27. Kalman R, Adler JH, Lazarovici G, Bar-On H, Ziv E. The efficiency of sand rat metabolism is responsible for development of obesity and diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1993;4:57-67.
28. Levy E, Thibault L, Garofalo C, et al. Combined n-3 and n-6 essential fatty deficiency is a potent modulator of plasma lipids lipoprotein composition, and lipolytic enzymes. *J Lipid Res* 1990;31:2009-2017.
29. Wanon J, Guertin F, Brunet S, et al. The effects of cholesterol uptake from high-density lipoprotein subfractions on biliary sterol secretion in rats with essential fatty-acid deficiency. *Hepatology* 1988;27:779-786.
30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
31. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959;234:466-468.

32. Brown MS, Goldstein JL, Dietschy JM. Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat. *J Biol Chem* 1979;254:5144-5149.
33. Levy E, Garofalo C, Rouleau T, Gavino V, Bendayan M. Impact of essential fatty acid deficiency on hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 1996;23:848-857.
34. Ericson SK, Shrewsbury MA, Brooks C, Meyer DJ. Rat liver acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase: its regulation in vivo and some properties in vitro. *J Lipid Res* 1980;21:930-941.
35. Kanety H, Moshe S, Shafrir E, Lunenfeld B, Karasik A. Hyperinsulinemia induces a reversible impairment in insulin receptor function leading to diabetes in the sand rat model of NIDDM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1853-1857.
36. Gadot M, Leibowitz G, Shafrir E, Cerasi E, Gross DJ, Kaiser N. Hyperproinsulinemia and insulin deficiency in the diabetic *Psammomys obesus*. *Endocrinology* 1994;135:610-616.
37. Gadot M, Ariav Y, Cerasi E, Kaiser N, Gross DJ. Hyperproinsulinemia in the diabetic *Psammomys obesus* is a result of increased secretory demand on the β -cell. *Endocrinology* 1995;136:4218-4223.
38. Ziv E, Kalman R, Hershtkop K, Barash V, Shafrir E, Bar-On H. Insulin resistance in the NIDDM model *Psammomys obesus* in the normoglycemic normoinsulinemic state. *Diabetologia* 1996;39:1269-1275.

39. Adler JH, Lazarovici G, Marton M, Levy E. The diabetic response of weanling sand rats (*Psammomys Obesus*) to diets containing different concentrations of salt bush (*Atriplex Halimus*). *Diabetes Res* 1986;3:169-171.
40. Barnett M, Collier GR, Zimmet P, O'Dea K. The effect of restricting energy intake on diabetes in *Psammomys obesus*. *Int J Obes* 1994;18:789-794.
41. Adler JH, Lazarovici G, Marton M, Levy E. The diabetes response of weanling sand rats (*Psammomys obesus*) to diets containing different concentrations of salt-bush (*Atriplex halimus*). *Diabetes Res* 1996;3:169-171.
42. Kalman R, Ziv E, Adler JH, Lazarovici G, Bar-On H. The efficiency of the sand rat metabolism is responsible for the development of obesity and diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1993;4:57-68.
43. Habito RC, Barnett M, Yamamoto A, et al. Basal glucose turnover in *Psammomys obesus*, an animal model of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 1995;32:187-192.
44. Barnett M, Collier GR, Collier FM, Zimmet P, O'Dea D. A cross-sectional and short-term longitudinal characterization of NIDDM in *Psammomys obesus*. *Diabetologia* 1994;37:671-676.
45. Betteridge DJ. Diabetic dyslipidemia. *Eur J Clin Invest* 1999;29(Suppl. 2):12-16.
46. Marquié G, Duhault J, Hadjiisky P, Petkov P, Bouissou H. Diabetes mellitus in sand rats (*Psammomys obesus*): microangiopathy during development of the diabetic syndrome. *Cell Mol Biol* 1991;6:651-667.

47. Marquié G, Hadjiisky P, Arnaud O, Duhault J. Development of macroangiopathy in sand rats (*Psammomys obesus*), an animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of gliclazide. *Am J Med* 1991;90(Suppl 6A):55S-61S.
48. Hadjiisky P, Renais J, Scebat L. A comparative study of the arterial tissue metabolic in atheroresistant species. Comparison between rabbit and rat aortas. *Arterial Wall* 1981;7/4:155-166.
49. Falcone DJ, Hajjar DP, Minick CR. Enhancement of cholesterol and cholesteryl ester accumulation in reendothelialized aorta. *Am J Pathol* 1980;99:81-104.
50. Easom RA, Zammit VA. Effects of diabetes on the expressed and total activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver in vivo. *Biochem J* 1985;230:747-752.
51. Goodman MW, Michells LD, Kean WF. Intestinal and hepatic cholesterol synthesis in the alloxan diabetic rat. *Proc Soc Exp Med* 1982;170:286-290.
52. Young NL, Sandek CD, Crawford SA. Total hydroxymethyl-glutaryl CoA reductase activity in the small intestine and liver of insulin-deficient rats. *J Lipid Res* 1982;23:266-275.
53. Renold AE, Porte D Jr, Shafrir E: Definitions of diabetes types: use and abuse of the concept "animal models of diabetes mellitus". In: Shafrir E, Renold AE, eds. *Frontiers in diabetes research. Lessons from animal diabetes*. II ed. John Libbey & Company Ltd., 1988;3-7.

54. Scott LM, Tomkin GH. Changes in hepatic and intestinal cholesterol regulatory enzymes: the influence of metformin. *Biochem Pharmacol* 1983;32:827-830.
55. O'Meara NMG, Devery RAM, Owen D, Collins PB, Johnson AH, Tomkin GH. Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes* 1990;29:626-633.
56. Shefer S, Hauser S, Bekersky I, Mosbach EH. Biochemical site of regulation of bile acid synthesis in the rat. *J Lipid Res* 1970;11:404-411.
57. Subbiah MTR, Yunker RL. Cholesterol 7 α -hydroxylase of rat liver: an insulin sensitive enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;124:896-902.
58. Twisk J, Hoekman MFM, Lehmann EM, Meizer P, Mager WH, Princen HMG. Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription. *Hepatology* 1995;21:501-510.
59. Gutman A, Andreus A, Adler JH. Hyperinsulinemia, insulin resistance and cataract formation in sand rats. *Isr J Med Sci* 1975;11:714-722.
60. Turner NC, Clapham JC. Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. *Progress in Drugs Research* 1998;51:33-94.

LEGENDS

Figure 1: Plasma lipids in the different *Psammomys obesus* groups. After sacrifice, blood samples were collected on EDTA and centrifuged. Lipid concentrations of Groups A (n=16), B (n=21) and C (n=13) were determined in fresh plasma. Values are means \pm SE.

Figure 2: Plasma lipoprotein concentrations in *Psammomys obesus*. Lipoproteins were isolated by ultracentrifugation and their cholesterol content was measured as described in the Methods section. Values are means \pm SE for n=16 in Group A, n=21 in Group B and n=13 in Group C.

Figure 3: Lipoprotein electrophoresis of plasma from Group A, B and C animals. With this technique, β -lipoproteins, pre- β -lipoproteins and α -lipoproteins are visualized by oil red O.

Figure 4: SDS-PAGE of VLDL (A), LDL (B), HDL₂ (C) and HDL₃ (D). The location of apolipoprotein species from the different groups of animals was identified by comparison with purified apolipoproteins and molecular weight standards (STD): phosphorylase B (92.500 da), BSA (66.200 da), ovalbumin (45.000 da), carbonic anhydrase (31.000 da), soybean trypsin inhibitor (21.500) and lysozyme (14.400).

Figure 5: Liver lipid content of the various *Psammomys obesus* groups. Following sacrifice, liver specimens were removed, excised, rinsed, and homogenized. Lipids were extracted by chloroform/methanol (2:1) and quantified by enzymatic techniques, as detailed in the Methods section. Values are means \pm SE for n=4 in Group A, n=7 in Group B and n=4 in Group C.

Figure 6: Activity of liver HMG-CoA reductase, ACAT and cholesterol 7 α -hydroxylase. As described in the Methods section, *Psammomys* liver microsomes were prepared and assayed for the three key regulatory cholesterol enzymes. The data represent means \pm SE for n= 12 in Group A, n= 14 in Group B and n= 14 in Group C.

Figure 7: Correlation between plasma lipids and glucose/insulin levels. TG, TC, FC were plotted as a function of plasma insulin and glucose. A positive correlation was noted for all the variables.

Figure 8: Correlation between lipids parameters and liver weight. A positive correlation was noted for all the variables.

Table 1: Characteristics of control, insulin resistant and diabetic animals^a

Parameter	A	B	C
Glucose (mmol/L)	3.8±0.1	4.2±0.2	18.3±1.1 ^{b,c}
Insulin (pmol/L)	56.1±6.4	631.9±134.1 ^b	3960.5±747.5 ^{b,c}
Body wt (g)	162.3±5.4	196.6±6.4 ^b	217.0±5.0 ^{b,d}
Adipose tissue wt (g)	3.4±0.5	5.0±0.5 ^e	8.2±0.5 ^b
Liver wt (g)	4.8±0.2	6.6±0.3 ^b	8.4±0.2 ^{b,f}

^aValues are means ± SEM for $n=16$ in group A, $n=21$ in group B and $n=13$ in group C. The adipose tissue weight given is the total weight of excisable perirenal adipose tissue.

^b $p<0.001$, vs control

^c $p<0.001$, vs Group B

^d $p<0.05$, vs Group B

^e $p<0.05$, vs Group C

^f $p<0.005$ vs Group B

Table 2: Chemical lipoprotein characterization^a

Lipoprotein	TG	CE	FC	PL	PR	TG/PL	TG/PR	CE/PR	TG+CE/ FC+PL+PR
	(mg/100 mg of lipoprotein)					(Ratios)			
<u>VLDL</u>									
A	51.8±6.3	3.0±0.4	5.2±0.5	14.4±1.5	25.4±4.6	4.30±1.18	3.05±1.07	0.15±0.04	1.59±0.49
B	51.8±3.5	3.9±0.4	5.9±0.4	16.1±0.5	22.2±3.7	3.24±0.21	3.13±0.56	0.22±0.05	1.38±0.17
C	57.3±1.9	3.1±0.4	5.3±0.2	17.7±0.8	16.6±1.2	3.29±0.20	3.65±0.44	0.19±0.02	1.55±0.10
<u>IDL</u>									
A	27.1±2.4	8.4±0.9	6.4±0.5	25.0±3.4	33.1±3.6	1.32±0.23	0.90±0.13	0.28±0.04	0.57±0.06
B	27.7±1.5	13.3±1.2 ^b	7.2±0.5	24.4±2.0	27.3±2.7	1.18±0.09	1.11±0.14	0.50±0.04 ^d	0.70±0.03 ^f
C	27.4±2.0	12.2±0.7 ^c	6.9±0.4	27.4±0.9	27.6±2.2	1.01±0.10	1.06±0.15	0.46±0.04 ^e	0.65±0.05
<u>LDL</u>									
A	17.8±1.2	22.3±2.0	8.4±0.6	25.4±0.8	25.1±1.0	0.71±0.05	0.72±0.05	0.90±0.08	0.69±0.04
B	12.4±0.9 ^d	28.2±1.1 ^b	9.0±0.4	27.3±0.8	23.1±1.1	0.46±0.04 ^d	0.54±0.03 ^d	1.26±0.11 ^b	0.69±0.01
C	10.7±0.5 ^d	28.1±1.0 ^b	9.6±0.6	32.4±1.5 ^{d,e}	19.2±1.2 ^{d,e}	0.34±0.02 ^{c,d}	0.57±0.05	1.48±0.05 ^c	0.64±0.03
<u>HDL₂</u>									
A	1.0±0.08	25.4±0.7	4.0±0.1	32.9±0.9	36.7±1.2	0.029±0.002	0.27±0.002	0.70±0.04	0.36±0.01
B	0.9±0.08	26.0±0.6	4.2±0.2	34.2±0.5	34.7±1.0	0.026±0.003	0.026±0.003	0.76±0.04	0.37±0.01
C	1.1±0.11	26.2±0.9	4.3±0.2	36.9±0.8 ^{d,e}	31.5±1.0 ^{c,f}	0.031±0.003	0.037±0.004	0.84±0.05 ^f	0.38±0.02 ^f
<u>HDL₃</u>									
A	0.58±0.07	23.5±0.9	2.6±0.1	29.9±0.9	43.4±1.4	0.019±0.002	0.014±0.002	0.55±0.04	0.32±0.02
B	0.61±0.07	22.5±0.5	2.4±0.2	29.7±0.8	44.8±0.9	0.021±0.003	0.014±0.002	0.51±0.02	0.30±0.01
C	0.72±0.08	21.3±0.8	2.4±0.1	33.2±0.5 ^{f,g}	42.4±1.2	0.022±0.002	0.017±0.002	0.51±0.03 ^{d,e}	0.28±0.01 ^f

^a Lipoproteins were isolated from plasma by sequential ultracentrifugation. All the lipoprotein fractions were characterized by determining the percent distribution of TG (triglyceride), CE (cholesteryl ester), FC (free cholesterol), PL (phospholipid) and PR (protein). Data are means ± SE for $n=7$ in group A, $n=10$ in group B and $n=7$ in group C.

^b $p<0.03$, vs A

^c $p<0.01$, vs C

^d $p<0.005$ vs A

^e $p<0.03$ vs B

^f $p<0.05$ vs A

^g $p<0.05$, vs B

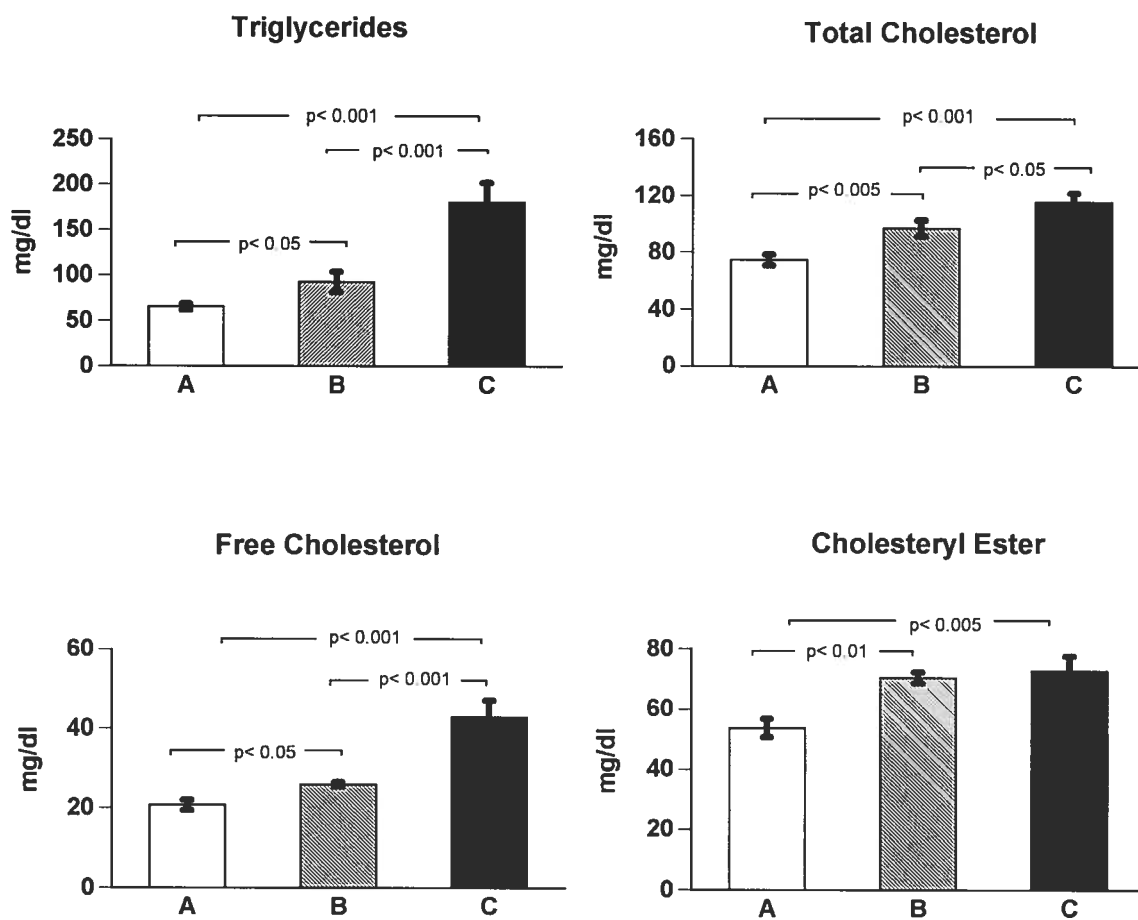
Figure 1

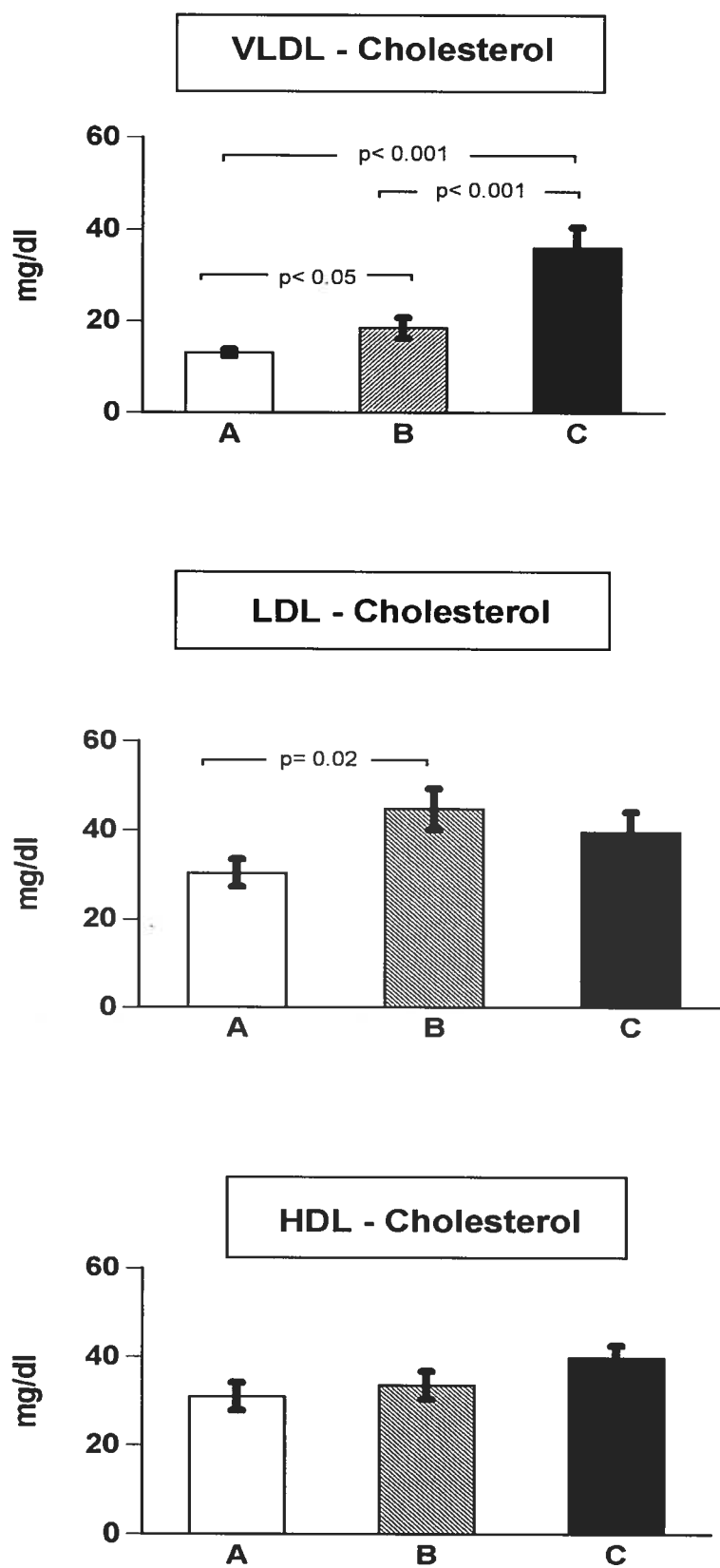
Figure 2

Figure 3

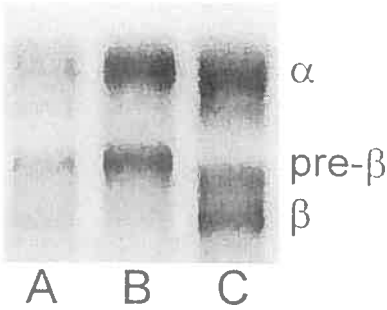


Figure 4

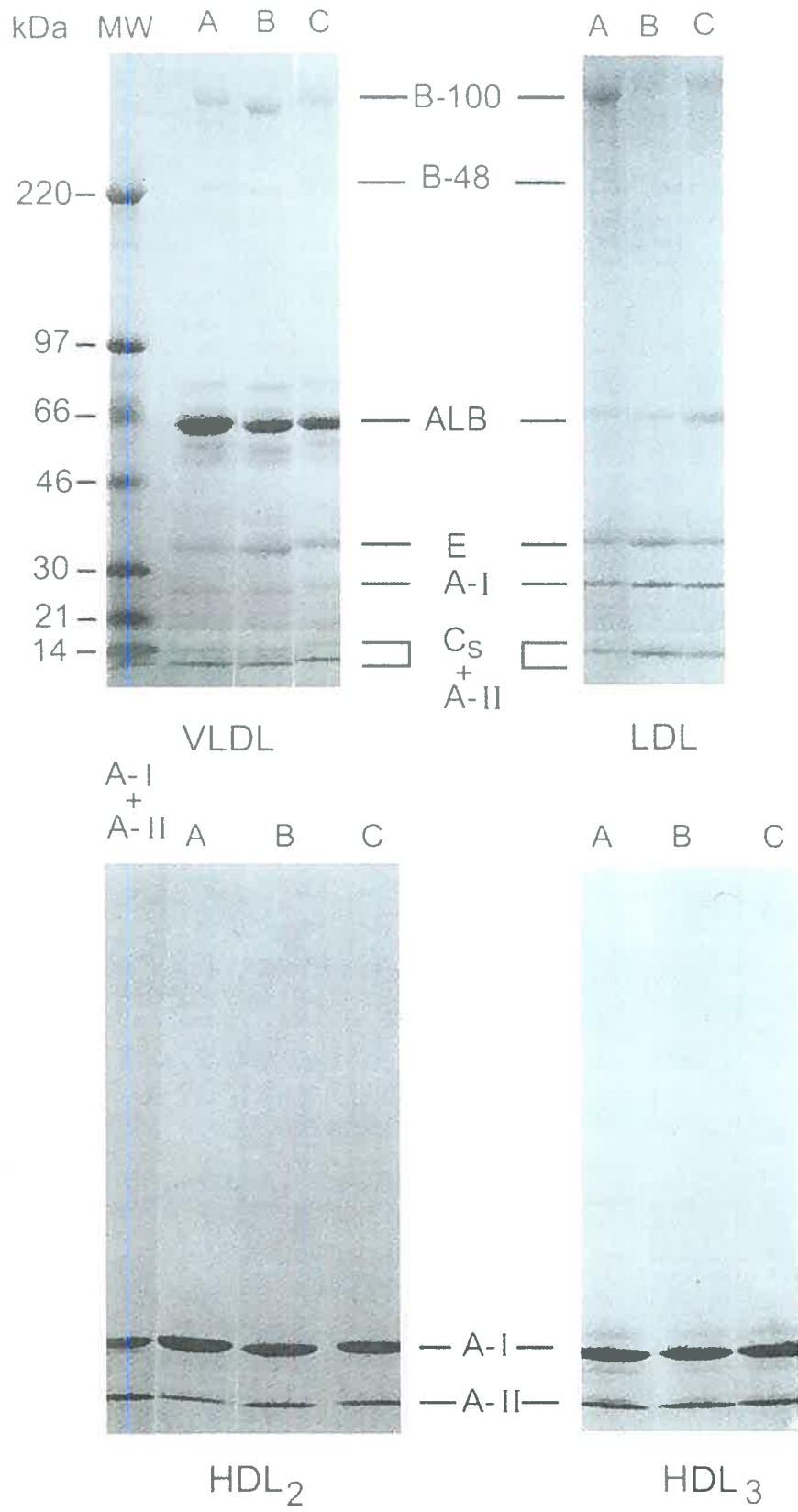


Figure 5

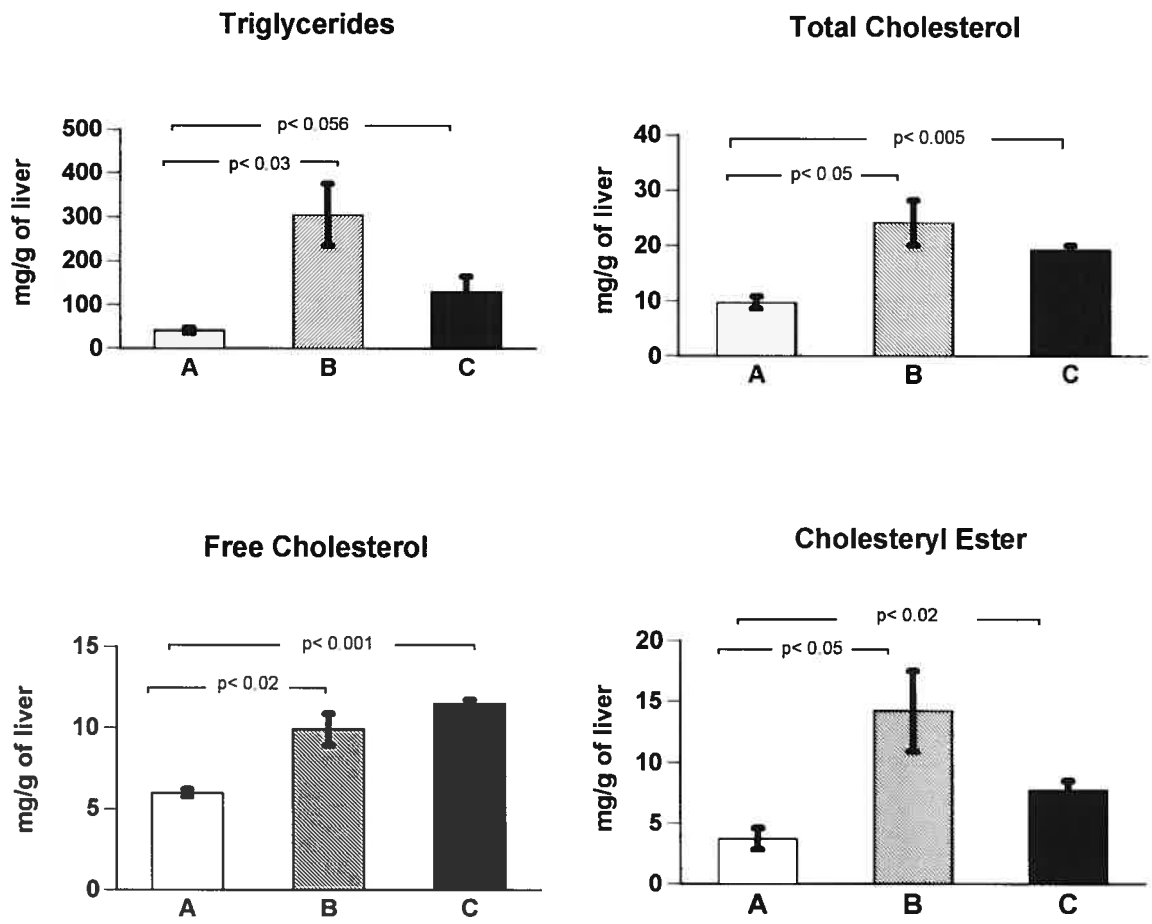


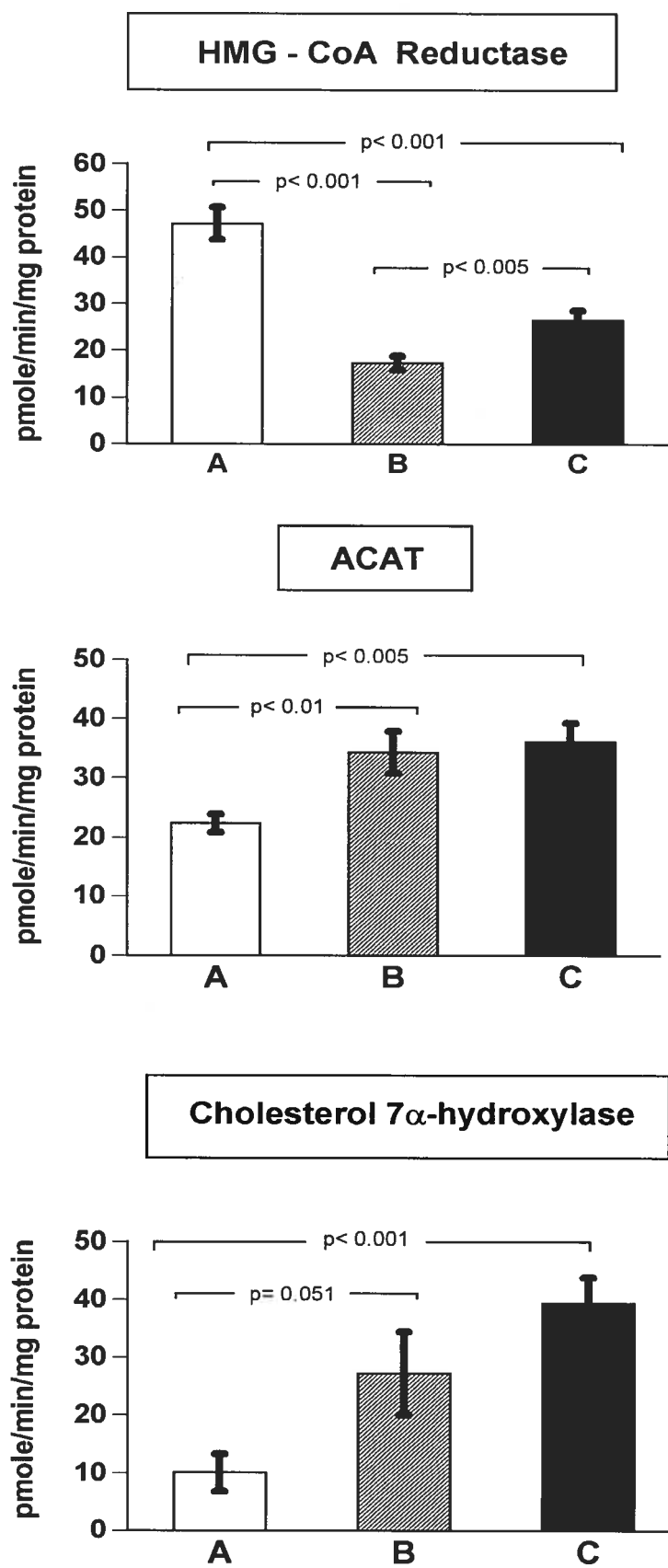
Figure 6

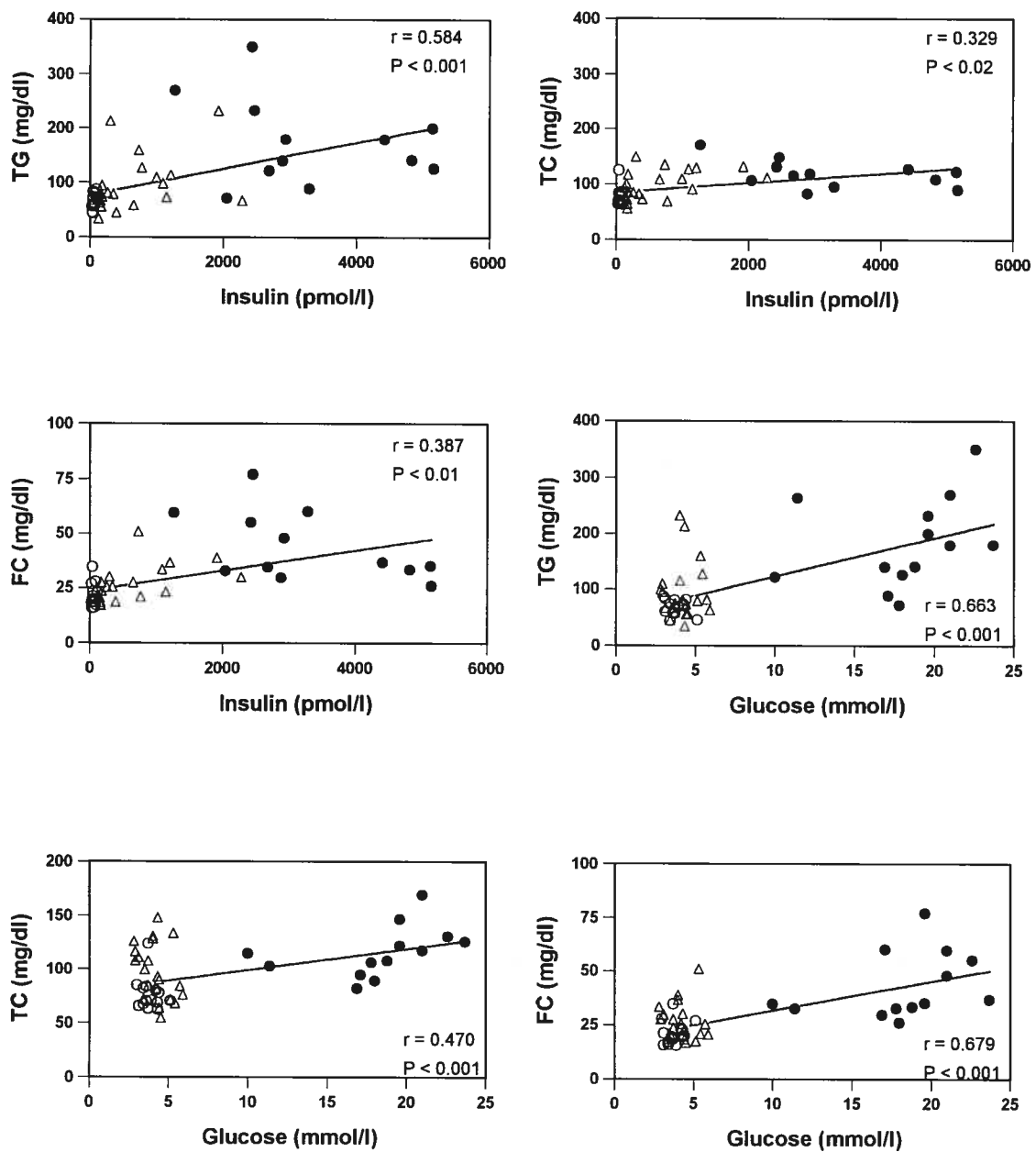
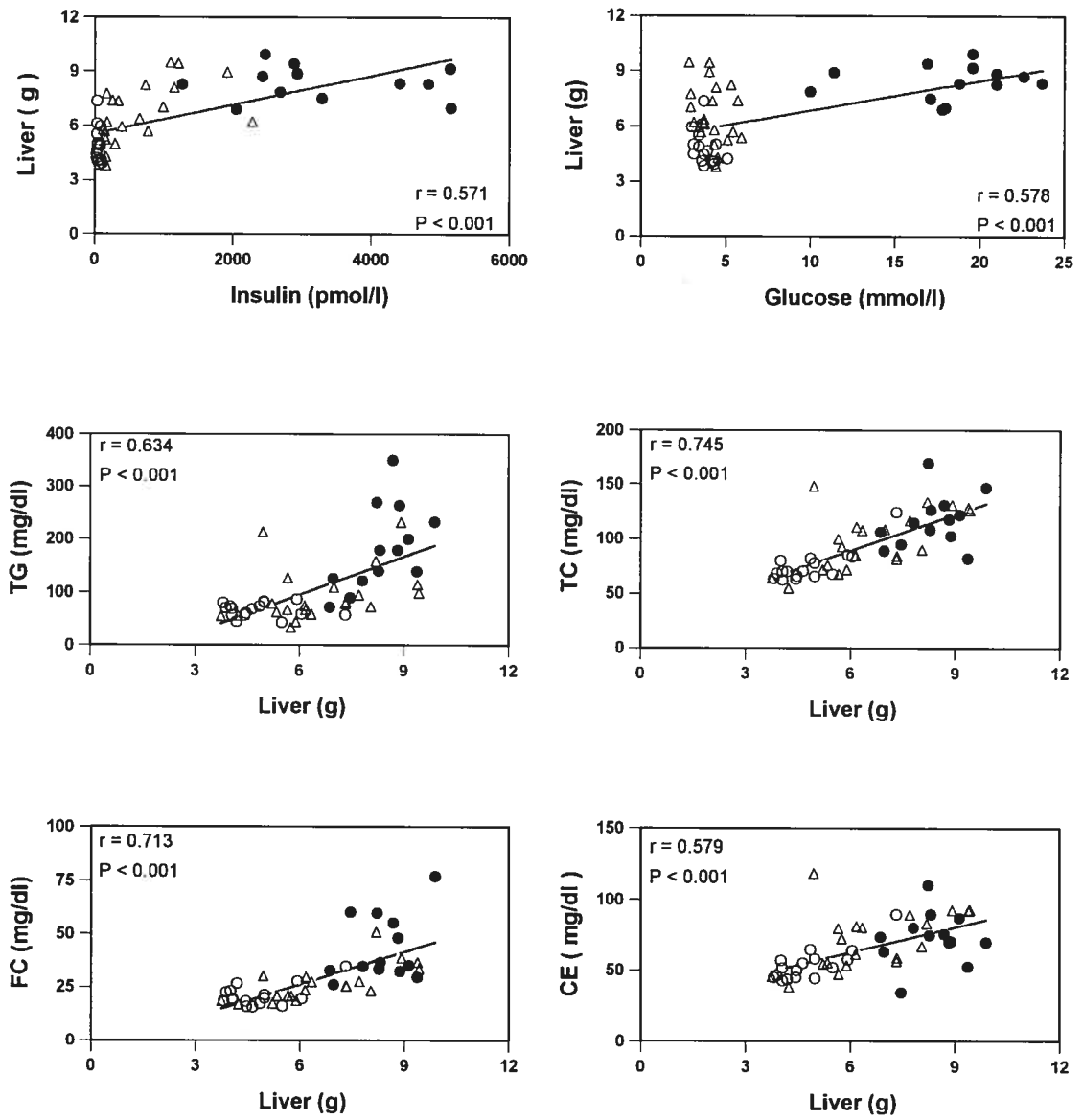
Figure 7

Figure 8

3. Article 2

**Article soumis à Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology,
2002**

BOTH INSULIN RESISTANCE AND DIABETES IN *PSAMMOMYS OBESUS* UPREGULATE THE HEPATIC MACHINERY INVOLVED IN INTRACELLULAR VLDL ASSEMBLY

M. Zoltowska^{1,2}, E. Ziv⁶, E. Delvin^{1,3}, M. Lambert^{1,4}, E. Seidman^{1,5} and E. Levy^{1,2}

¹Centre de Recherche Hôpital Sainte-Justine, Departments of ²Nutrition, ³Biochimistry, ⁴Genetics and ⁵Pediatrics, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5

and

⁶Diabetes Unit, Division of Internal Medicine, Hadassah University Hospital, Jerusalem 91120, Israel

Running Head: VLDL overproduction mechanisms in *Psammomys obesus*

Address correspondence to:

Dr. Emile Levy
Centre de recherche
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5
Tel.: (514) 345-4626
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT.

Objective: In the current study, we examined the mechanisms regulating hepatic apo B-containing lipoprotein secretion in *Psammomys obesus*, a very suitable animal model for the investigation of insulin resistance and diabetes. **Methods and Results:** When fed *ad libitum* chow, 22% maintain normoglycemia and normoinsulinemia (Group A), 33% exhibited normoglycemia and appreciable hyperinsulinemia (Group B), and 45% develop overt diabetes (Group C). Body weight gain, plasma FFA elevation, hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia characterized Groups B and C. Triton WR-1339 injection, at fasting, resulted in higher plasma VLDL-TG and VLDL-apo B accumulation in Groups B and C, suggesting increased VLDL production by the liver. Pulse-chase labelling experiments in cultured hepatocytes with [³⁵S]-methionine revealed reduced intracellular degradation and enhanced secretion of newly synthesized apo B in Groups B and C. Concomitant with the raised triglyceride and cholesterol contents in the liver of Groups B and C, there was an increase in lipogenesis and in the activity of microsomal triglyceride transfer protein (MTP), monoacylglycerol transferase and diacylglycerol transferase. Pre-treatment of hepatocytes with proteasomal inhibitors eliminated the differences in apo B secretion among Groups A, B and C. **Conclusions:** Our data indicate that both insulin resistance and diabetes triggered the intracellular machinery involved in VLDL assembly and secretion.

Keywords: Insulin resistance, diabetes, VLDL production, apo B degradation, MTP

INTRODUCTION

Non-insulin dependent diabetes mellitus is a major cause of morbidity and mortality in industrialized nations where it has reached epidemic levels.¹ It is characterized by peripheral insulin resistance, increased hepatic glucose production, and defects in insulin secretion from pancreatic β cells.² The most commonly recognized lipid abnormality in this disorder is hypertriglyceridemia, which is known to be an independent risk factor for coronary heart disease.³ Although still a matter of debate, the hypertriglyceridemic state can be produced through two mechanisms: increased synthesis of very-low-density lipoprotein (VLDL) and the removal defect of plasma triglycerides.⁴ The overproduction of VLDL is probably caused by an enhanced hepatic influx of free fatty acids (FFA).⁵ However, further research is necessary to resolve the conflicting status of hepatic VLDL secretion in hyperinsulinic conditions, since data in humans and animals have generally suggested that chronic hyperinsulinemia facilitates VLDL production, others have pointed out the failure of insulin to down-regulate VLDL secretion, whereas the majority of *in vitro* studies using cultured hepatocytes and hepatoma cell lines have demonstrated insulin's acute inhibitory effect.⁴⁻⁶

Animal models are required for the study of the mechanisms behind insulin resistance and type 2 diabetes and for a better understanding of diabetes complications in human populations. Prominent among these animal species is the Israeli desert gerbil *Psammomys obesus* (sand rat), which appears to be an ideal natural model of the human disease because it shows an increased tendency to develop diet-induced diabetes, which is associated with moderate obesity.⁷⁻⁹ The results indicate that the metabolism of *Psammomys* is well adapted towards life in a low energy environment where *Psammomys* takes advantage of its capacity for constant accumulation of adipose tissue

for maintenance and breeding in periods of scarcity.⁷⁻⁹ This metabolism known as “thrifty metabolism,” is compromised when nutrient intake is high.¹⁰ Examples can be found among the Pima Indians, Australian Aborigines and many other Third World populations.^{11, 12} Therefore, we consider that *Psammomys* with insulin resistance and hyperglycaemia may be very useful for the study of hypertriglyceridemia mechanisms.

Apolipoprotein B (apo B) is an essential structural protein for the assembly of lipoproteins by the liver and intestine.¹³⁻¹⁵ Apo B-48, designated as the percentage of the N terminus of the largest secretory product apo B-100, is produced from a single gene transcript by mRNA editing and proteolytic cleavage.¹⁵⁻¹⁸ The regulation of apo B hepatic secretion rate is postranscriptional.¹⁹⁻²⁰ Only a portion of *de novo* synthesized apo B is secreted while the remaining portion is degraded intracellularly.²¹ Insulin-stimulated apo B degradation may involve phosphatidyl-inositol 3-Kinase (PI3K), translocation to the endoplasmic reticulum (ER) membrane and the sorting of apo B to a post-ER degradative pathway without changing total apo B mRNA levels.²² We have employed the Israeli desert gerbil *Psammomys obesus* in the present study in our search for the molecular background of the mechanisms mediating the overproduction of VLDL in the insulin-resistant state resulting from overnutrition. The utilization of this animal model will help illustrate the regulation of apo B synthesis and apo B-containing lipoprotein assembly in association with the development of a world-wide diabetes epidemic in human populations emerging from food scarcity to nutritional affluence that is inappropriate to metabolic capacity.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Psammomys obesus gerbils (age 2.5 - 3.5 months) from the Hebrew University colonies were obtained from Harlan (Jerusalem, Israel). After weaning, *Psammomys obesus* animals were maintained on a low energy diet containing 2.38 kcal/g (Koffolk, Petach Tikva, Israel) until the beginning of the experiments. They were then switched to a high energy diet (2.93 kcal/g; Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) for 2 weeks. Water and food were supplied ad libitum. Animals were classified into three groups (A, B, C) according to plasma glucose and insulin concentrations. All experimental procedures performed in the study were authorized by the Institutional Animal Care Committee.

In Vivo Hepatic VLDL-TG and VLDL-Apo B Production

Animals were deprived of food overnight before the injection of Triton WR-1339 via a catheter inserted into the carotid artery. Anaesthesia with ketamine (80 mg/kg) was maintained throughout the experimental period. Triton diluted in saline (300 mg/ml) and warmed to 37°C was injected slowly (400 mg/kg of body weight). Blood was collected 1 h after Triton injection, plasma separated from red blood cells, and VLDL isolated at $d < 1.006$ g/ml by ultracentrifugation.²³ VLDL-TG_s were measured by enzymatic methods.²⁴ VLDL-apo B was selectively precipitated with isopropyl alcohol.²⁵ Total protein was determined in the supernatant and VLDL-apo B calculated by difference.

Lipogenesis

Psammomys Obesus gerbils were deprived of food during 5 h before being injected intraperitoneally with 10 mCi $^3\text{H}_2\text{O}$ in order to determine hepatic fatty acid incorporation, as described by Hems et al.²⁶ One hour later, the animals were anaesthetized, blood collected and the liver removed. Lipids were hydrolyzed and extracted²³ radioactivity in plasma and liver was measured by liquid scintillation counting.

Preparation of Hepatocytes:

Hepatocytes were prepared in sterile conditions by collagenase perfusion of the male *Psammomys obesus*, as described previously.²⁷ The viability of the hepatocytes was measured by Trypan Blue exclusion and was usually between 92 and 95%. The cells were plated in 60-mm dishes at a density of 3×10^6 cells/dish until the cells formed a monolayer (4h). After cell attachment, the medium was removed, the monolayer was washed twice with PBS, and the cells were cultured for 0.5 h in serum-free, methionine-free medium containing the above antibiotics and amino acids.

Pulse-Chase, Immunoprecipitation and Radioassay of Labelled Apo B

At the end of this period, a trace amount of [^{35}S]-methionine (117 Ci/mmol; 200 μCi) was added to each dish for a further period of 1 h (pulse period). The medium was removed and the monolayer was washed twice with PBS. At this stage, some dishes were removed to measure label incorporation into cellular apo B. Supplemented medium containing unlabeled methionine (10 mmol/L) was added to the remaining cells.

The cells were cultured for further periods of 1, 2, 4 or 16 h. The media were collected, adjusted to 1.0 mmol/L PMSF, 1.0 mmol/L benzamidine, 5.0 mmol/L EDTA, and 50 µg/ml aprotinin, and centrifuged at 1,500 g for 5 min at 4°C to remove loose cells. Labelled apo B was immunoprecipitated from the cells and media, as described previously, using anti-*Psammomys* apo B antiserum raised in rabbits, and subjected to SDS-PAGE electrophoresis in a 4-20% gradient polyacrylamide gel. The bands corresponding to apo B-100 and apo B-48 were identified by radioactive molecular mass standards (run under the same conditions), sectioned and counted after incubation overnight with 1 ml BTS-450 (Beckman) and 10 ml of ready safe scintillation fluid (Beckman).

Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) Activity

Liver microsomes, used as the source of MTP activity, were isolated, as described previously.²⁸ MTP activity was determined by a transfer assay described in details previously.^{28,29} Lipid transfer activity is expressed as percentage of TG transfer per unit time in conditions under which it had been verified that the assay was linear (first order kinetics).

Biochemical Analyses

Plasma insulin levels were determined by radioimmunoassay using a human primary antibody (Phadesph; Kabi Pharmacia Diagnostics, Sweden). Plasma glucose, triglyceride and cholesterol levels were measured enzymatically (Boehringer-

Mannheim, Mannheim, Germany). Free fatty acids were determined as described previously.³⁰

Enzyme Assays

Liver microsomes were prepared and stored at -70°C.^{24, 28} The microsomal activity of monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT) was determined as reported by Coleman³¹, whereas that of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) was assayed as described previously.³² Only minor variations to the radioactive precursor and extraction method were made.

Statistical Analysis

Data were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) to assess differences in the parameters studied. Differences between mean values were evaluated by the student's two tailed t-test.

RESULTS

Animal Model Characteristics

When the animals were fed chow *ad libitum*, 22% maintain normoglycemia and normoinsulinemia (Group A), 33% exhibited normoglycemia and appreciable hyperinsulinemia (Group B), and 45% developed overt diabetes (Group C) (Fig.1). Body weight gain and elevated FFA values characterized the animals of Groups B and C (Fig.2). An increase in body weight is noteworthy despite the absence of hyperphagia documented by similar food consumption expressed either as g/day (Group A: 15.0 ± 0.5 ; Group B: 14.7 ± 0.8 ; Group C: 14.6 ± 0.7) or as g/100g animal weight (Group A: 7.0 ± 0.6 ; Group B: 6.7 ± 0.8 ; Group C: 6.6 ± 0.9).

Plasma Lipids and In Vivo Hepatic VLDL Secretion

Concomitant with the apparent signs of insulin resistance and diabetes, *Psammomys obesus* displayed abnormalities in lipid concentrations. Figure 2 depicts the spectrum of lipid profiles, ranging from normal lipemia in Group A to hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia in Groups B and C. Furthermore, lipogenesis ($\mu\text{g } ^3\text{H incorporated} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) in Groups B (31.5 ± 4.9) and C (38.6 ± 6.1) was higher ($p < 0.05$) than that of Group A (20.1 ± 3.4). In order to determine whether enhanced VLDL secretion by the liver contributed to the high levels of plasma TG, we used the well-characterized method of Triton WR-1339 injection to block the peripheral removal of newly secreted VLDL, while simultaneously monitoring the rate of TG accumulation *in vivo*. As shown in Figure 3A, the administration of Triton WR-1339 resulted in the accumulation of VLDL-TG in all animal groups. However, the VLDL-

TG secretion rate in Groups B (38.4%, $p < 0.01$) and C (47.5%, $p < 0.005$) was significantly higher than in Group A. Similarly, the rate of total VLDL-apoB production was significantly increased by 99.9% ($p < 0.001$) in Group B and by 168% ($p < 0.001$) in Group C compared with controls (Fig. 3B). Changes in VLDL-TG production can be due to changes in VLDL-TG production per VLDL particle, the number of VLDL particles, or both. Since one apo B molecule is secreted per VLDL particle, VLDL-apo B production provides an assessment of the number of VLDL particles secreted. Once the ratios of apo B/ TG were calculated in our studies, they displayed higher values in Groups B (2.44) and C (2.56) than in Group A (1.69). Therefore, our data are consistent with an actual increase in the secretion of VLDL particles and not simply an elevation in the TG content of VLDL. These results suggest that the insulin resistance and diabetic conditions modulate hepatic VLDL-TG and VLDL-apo B secretion rate by promoting the assembly of an elevated number of VLDL vehicles.

In Vitro Apo B Synthesis

To define the mechanisms of insulin resistance- and diabetes-stimulated secretion of apo B in *Psammomys obesus*, we used intact hepatocytes. First, hepatocytes were pulsed with [^{35}S]-methionine for 10 min and chased for 90 min. As observed in Figure 4, there was an apparent degradation of apo B in all animal groups before significant secretion of apo B had occurred. Indeed, when the values from the 10 min chase time point were taken as 100% and the cellular content of radiolabeled apo B was monitored over an additional 90 min of chase with excess cold methionine, they indicated a continuous fall in the relative amount of immunoreactive apo B-48 and apo B-100 in the hepatocytes of all animal groups. However, there was much less degradation of newly

synthesized apo B in Groups B and C than Group A. Radiolabeled apo B was detected in the medium after 30 min of chase. Nevertheless, the level of [^{35}S]-labeled apo B recovered from B and C media was always higher than that from A media. Besides, no appreciable effects were observed in *de novo* albumin synthesis. (Results not shown). The amount of radiolabeled albumin immunoprecipitated from the cells (quantified by cutting and scintillation counting of the bands) was similar among hepatocytes derived from Groups A, B and C. This again confirmed the notion that these conditions do not alter the specific synthesis of individual proteins such as albumin. Overall, our pulse chase experiments have documented that insulin resistance and diabetes increased the secretion of newly synthesized apo B by inhibiting its degradation in hepatocytes of *Psammomys obesus*.

MTP Activity

To explore further the putative effects of insulin resistance and diabetes on MTP activity, the livers of *Psammomys obesus* were subjected to subcellular fractionation and microsome isolation. Analysis of hepatic triglyceride transfer activity revealed an increase in Group B (46% $p < 0.006$) and Group C (56% $p < 0.0003$) compared with control animals (Figure 5). These observations suggest that insulin resistance and diabetes confer increases in liver MTP activity.

Hepatic Lipid Synthesis and Liver Enzyme Activities

In the next step, we quantified the lipid content in the liver of *Psammomys obesus*. As shown in Table 1, the concentrations of triglycerides and cholesterol were higher in Groups B and C than with the control Group A. Thus, it is possible that the

provision of lipids directs apo B into the secretion pathway. Since both enzymes GPAT and DGAT are considered as the regulatory enzymes in the liver⁴⁷, we have determined their activity in isolated microsomes. As indicated in Figure 6, the specific activity of GPAT remains relatively unchanged among Groups A, B and C. However, DGAT activity significantly increased in Group B and displayed a trend of elevation in Group C, compared with Group A. Noteworthy is the increase in DGAT (Figure 6), which is consistent with TG biosynthesis and accumulation, as well as VLDL production by the liver of Groups B and C.

In our studies, the specific activity of MGAT was increased in Groups B and C (Figure 6), suggesting that the monoacylglycerol pathway of glycerolipid synthesis is also induced in the insulenic resistant and diabetic liver of *Psammomys obesus*.

VLDL–Apo B Secretion and Proteasome Inhibition

To determine whether proteasome inhibition affected the secretion of VLDL-apo B, primary hepatocytes isolated from *Psammomys obesus* were treated with powerful proteasome inhibitors. Without proteasome inhibitor supplementation, there was a significant elevation in the amount of VLDL-apo B secreted into the media by hepatocytes originating from Group B and C animals (Table 2), which thus confirmed the *in vivo* Triton WR-1339 studies (Figure 3). These observations suggested that the radiolabeled apo B content of hepatocytes from Group A disappeared more rapidly and they conversely supported enhanced efficiency of VLDL assembly and secretion in hepatocytes from Groups B and C. The addition of N-acetyl-leucyl-norleucinat (ALLN, 40 μ g) and lactacystin (1 μ M) led to the stimulated incorporation of [³⁵S]-methionine into VLDL-apo B released from hepatocytes of all animal groups compared with

untreated cells (Table 2). Nevertheless, the % increase in Group A allowed the hepatocytes to catch up to the values observed in Groups B and C. Thus, it is reasonable to conclude that the hepatic overproduction of apo B noted in insulin resistance and diabetes may be caused by the reduced degradation of apo B.

DISCUSSION

The gerbil *Psammomys obesus* offers an attractive model for investigating the interaction between both insulin resistance and diabetes with the mechanisms of hepatic TG-rich lipoprotein overproduction. Interestingly, its diabetic phenotype revealed itself during transfer from its native saltbush (*Atriplex halimus*) to a laboratory rodent diet, which is higher in energy (3.1 kcal/g) than its desert native food (1.9 kcal/g)³³. Our studies were able to demonstrate that hepatic VLDL-TG and VLDL-apo B secretion contribute to the characteristic hypertriglyceridemia in this interesting animal model. First, we used Triton WR-1339, a non-ionic detergent that coats VLDL particles, blocking the action of lipoprotein lipase *in vivo* and preventing VLDL catabolism³⁷. The accumulation of plasma TG-rich lipoproteins following Triton treatment reflects the TG secretion rate from the liver and intestine. Because the animals were fasted during this experiment, we assumed intestinal contribution to be minimal with TG output mainly from the liver.

Subsequently, pulse chase experiments with cultured hepatocytes confirmed that insulin resistance and diabetes led to a significant increase in apo B secretion in *Psammomys obesus*. Raised availability of neutral lipids as well as augmented MTP activity resulted in induced apo B degradation and apo B secretion. Likely, the enhanced apo B output in *Psammomys obesus* reflects adequate lipidation of apo B by MTP, a critical player in the early post-translational regulation of apo B^{38, 39}. Accordingly, genetic deficiency of MTP has been shown to be the basis for the lack of plasma apo B in patients with abetalipoproteinemia⁴⁰. Similarly, knockout mice exhibited a marked reduction in plasma apo B concentrations because of the severe impaired hepatic secretion of apo B-containing lipoproteins⁴¹. MTP inhibitors also led

to a substantial reduction in MTP activity with a lowering of plasma lipoprotein levels⁴². Conversely, increased secretion of VLDL-TG and VLDL-apo B was noted in mice with adenovirus-induced hepatic overexpression of MTP⁴³. Likewise, MTP activity and *in vivo* TG secretion were augmented in the hamster model of insulin resistance⁴⁴. Thus, our results suggest that increased MTP confers accelerated production of TG-rich apo B-containing lipoproteins in the liver of *Psammomys obesus* affected with insulin resistance and diabetes.

Since apo B lipidation plays an important role in regulating the assembly and secretion apo B-containing lipoproteins, we then decided to define hepatic lipid status. Our data indeed substantiated this hypothesis in view of high levels of TG, CE and PL measured in liver, homogenates, on the one hand, and the reduced proteasome degradation of apo B, on the other hand, in insulin resistant and diabetic animals. Abundant FFA may act as precursors of these lipids, which are capable of stabilizing the hydrophobic apo B in the lumen of the rough endoplasmic reticulum as well as stimulating VLDL assembly. Additionally, recent observations have proposed a link between hepatic MTP gene expression levels and the sustained influx of fatty acids to the liver in obese and hypertriglyceridemic rats⁴⁵. Overall, excess FA originating from lipogenesis and extrahepatic tissues could conceivably enhance hepatic TG deposition, VLDL lipid component building and VLDL output, thereby contributing to hyperlipidemia under pathophysiological states, including insulin resistance and diabetes. Compatible with this assumption are our results documenting in *Psammomys obesus* with insulin resistance and diabetes, increased activity of MGAT and DGAT, which are major control points for the regulation of TG synthesis by channelling FA CoA toward specific metabolic fates^{46, 47}.

ACKNOWLEDGMENT

The current work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (MT-10583) and the Canadian Heart Association as well as a research scholarship award/from the FRSQ. We also acknowledge the expert secretarial assistance of Schohraya Spahis.

REFERENCES

1. Seidell JC. Obesity, insulin resistance and diabetes--a worldwide epidemic. *Br J Nutr* 2000;83 Suppl 1:S5-S8.
2. DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988;37:667-687.
3. Moller DE. Insulin resistance. In: John Wiley & Sons L, ed. London: 1993:143-186.
4. Zammit VA, Waterman IJ, Topping D, McKay G. Insulin stimulation of hepatic triacylglycerol secretion and the etiology of insulin resistance. *J Nutr* 2001;131:2074-2077.
5. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996;97:2859-2865.
6. Sparks JD, Sparks CE. Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim Biophys Acta* 1994;1215:9-32.
7. Kalman R, Ziv E, Shafrir E, Bar-On H, Perez R. Psammomys obesus and the albino rat--two different models of nutritional insulin resistance, representing two different types of human populations. *Lab Anim* 2001;35:346-352.
8. Walder KR, Fahey RP, Morton GJ, Zimmet PZ, Collier GR. Characterization of obesity phenotypes in Psammomys obesus (Israeli sand rats). *Int J Exp Diabetes Res* 2000;1:177-184.

9. Shafrir E, Ziv E. Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance: the desert rodent *Psammomys obesus* and other animals in which insulin resistance leads to detrimental outcome. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1998;9:347-385.
10. Joffe B, Zimmet P. The thrifty genotype in type 2 diabetes: an unfinished symphony moving to its finale? *Endocrine* 1998;9:139-141.
11. Swinburn BA, Boyce VL, Bergman RN, Howard BV, Bogardus C. Deterioration in carbohydrate metabolism and lipoprotein changes induced by modern, high fat diet in Pima Indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:156-165.
12. O'Dea K, Traianedes K, Hopper JL, Larkins RG. Impaired glucose tolerance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in Australian aborigines from the desert. *Diabetes Care* 1988;11:23-29.
13. Havel RJ, Kane JP. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins and disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In: Scriver CE, Beaudet AL, Sly WE, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 1995:1841-1885.
14. Davis RA, Vance JE. Structure, assembly, secretion of lipoproteins. In: Vance DE, Vance JE, eds. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Amsterdam: Elsevier; 1996.
15. Teng B, Burant CF, Davidson NO. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 1993;260:1816-1819.

16. Hodges PE, Navaratnam N, Greeve JC, Scott J. Site-specific creation of uridine from cytidine in apolipoprotein B mRNA editing. *Nucleic Acids Res* 1991;19:1197-1201.
17. Smith HC, Kuo SR, Backus JW, Harris SG, Sparks CE, Sparks JD. In vitro apolipoprotein B mRNA editing: identification of a 27S editing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1489-1493.
18. Lau PP, Xiong WJ, Zhu HJ, Chen SH, Chan L. Apolipoprotein B mRNA editing is an intranuclear event that occurs posttranscriptionally coincident with splicing and polyadenylation. *J Biol Chem* 1991;266:20550-20554.
19. Bostrom K, Boren J, Wettesten M, Sjoberg A, Bondjers G, Wiklund O, Carlsson P, Olofsson SO. Studies on the assembly of apo B-100-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1988;263:4434-4442.
20. Pullinger CR, North JD, Teng BB, Rifici VA, Ronhild de Brito AE, Scott J. The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells: regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half-life. *J Lipid Res* 1989;30:1065-1077.
21. Borchardt RA, Davis RA. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion. *J Biol Chem* 1987;262:16394-16402.
22. Phung TL, Roncone A, Jensen KL, Sparks CE, Sparks JD. Phosphoinositide 3-kinase activity is necessary for insulin-dependent inhibition of apolipoprotein B

- secretion by rat hepatocytes and localizes to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1997;272:30693-30702.
23. Levy E, Menard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, Ziv E, Feoli-Fonseca JC, Seidman E. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem* 2001;276:39679-39684.
24. Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Stan S, Bar-On H, Kalman R, Levy E. Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in Psammomys obesus prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Atherosclerosis* 2001;157:85-96.
25. Egusa G, Brady DW, Grundy SM, Howard BV. Isopropanol precipitation method for the determination of apolipoprotein B specific activity and plasma concentrations during metabolic studies of very low density lipoprotein and low density lipoprotein apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1983;24:1261-1267.
26. Hems DA, Rath EA, Verrinder TR. Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of normal and genetically obese (ob/ob) mice during the 24-hour cycle. *Biochem J* 1975;150:167-173.
27. Kalderon B, Gutman A, Levy E, Shafrir E, Adler JH. Characterization of stages in development of obesity-diabetes syndrome in sand rat (Psammomys obesus). *Diabetes* 1986;35:717-724.
28. Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, Bendayan M. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in

- the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 2002;277:16470-16477.
29. Levy E, Stan S, Garofalo C, Delvin EE, Seidman EG, Menard D. Immunolocalization, ontogeny, and regulation of microsomal triglyceride transfer protein in human fetal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G563-G571.
30. Levy E, Garofalo C, Thibault L, Dionne S, Daoust L, Lepage G, Roy CC. Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency. *Am J Physiol* 1992 Feb;262(2 Pt 1):G319-26
31. Coleman RA. Diacylglycerol acyltransferase and monoacylglycerol acyltransferase from liver and intestine. *Methods Enzymol* 1992;209:98-104.
32. Schlossman DM, Bell RM. Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Evidence that the sn- glycerol-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase activities are dual catalytic functions of a single microsomal enzyme. *J Biol Chem* 1976;251:5738-5744.
33. Kalman R, Adler JH, Lazarovici G, Bar-On H, Ziv E. The efficiency of sand rat metabolism is responsible for development of obesity and diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1993;4:57-68.
34. Ziv E, Kalman R, Hershkop K, Barash V, Shafrir E, Bar-On H. Insulin resistance in the NIDDM model *Psammomys obesus* in the normoglycaemic, normoinsulinaemic state. *Diabetologia* 1996;39:1269-1275.

35. Ziv E, Shafrir E. Psammomys obesus: nutritionally induced NIDDM-like syndrome on a "thrifty gene" background. In: Shafrir E, ed. *Lessons from animal diabetes*. London: Smith-Gordon; 1995:285-300.
36. Coventry J, King H, Zimmet P, Raper LR, Sicree R. Impaired glucose tolerance in the biethnic (Melanesian and Indian) populations of Fiji. *Diabetes Res* 1986;3:427-432.
37. Li X, Catalina F, Grundy SM, Patel S. Method to measure apolipoprotein B-48 and B-100 secretion rates in an individual mouse: evidence for a very rapid turnover of VLDL and preferential removal of B-48- relative to B-100-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 1996;37:210-220.
38. Dixon JL, Furukawa S, Ginsberg HN. Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 1991;266:5080-5086.
39. Mitchell DM, Zhou M, Pariyarath R, Wang H, Aitchison JD, Ginsberg HN, Fisher EA. Apoprotein B100 has a prolonged interaction with the translocon during which its lipidation and translocation change from dependence on the microsomal triglyceride transfer protein to independence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14733-14738.
40. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992;258:999-1001.

41. Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL, Young SG. Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8686-8691.
42. Tietge UJ, Bakillah A, Maugeais C, Tsukamoto K, Hussain M, Rader DJ. Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1999;40:2134-2139.
43. Bartels ED, Lauritsen M, Nielsen LB. Hepatic expression of microsomal triglyceride transfer protein and in vivo secretion of triglyceride-rich lipoproteins are increased in obese diabetic mice. *Diabetes* 2002;51:1233-1239.
44. Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF, Adeli K. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem* 2000;275:8416-8425.
45. Lehner R, Kuksis A. Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 1996;35:169-201.
46. Sul HS, Wang D. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr* 1998;18:331-351.

47. Dircks LK, Sul HS. Mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1997;1348:17-26.

LEGENDS

Figure 1: Plasma glucose, insulin and body weight in normoglycemic and normoinsulinemic (Group A), normoglycemic and hyperinsulinemic (Group B) and hyperglycemic and hyperinsulinemic (Group C) animals. Values are means \pm SEM for n=11 in Group A, n= 17 in Group B and n= 23 in Group C.

^ap < 0.0001 vs. Groups A and B

^bp < 0.001 vs. Groups A and C

^cp < 0.05 vs. Group A

^dp < 0.05 vs. Groups A and B

Figure 2: Plasma lipids in *Psammomys obesus* animals. Triglycerides, cholesterol and free fatty acids (FFA) were determined immediately after sacrifice. Values are means \pm SEM, for n=11 in Group A, n=17 in Group B and n=23 in Group C.

^ap < 0.05 vs. Group A

^bp < 0.05 vs. Group A

^cp < 0.05 vs. Group B

^dp < 0.05 vs. Group A

Figure 3: *In vivo* production of VLDL-TG and VLDL-apo B. *Psammomys obesus* animals were fasted 5 h and were injected intravenously with Triton WR-

1339. The animals were bled 1 h after Triton injection and VLDL isolated by ultracentrifugation. The differences between baseline and 1-h plasma VLDL-TG (A) and VLDL-apo B (B) levels were measured after Triton WR-1339 injection. VLDL-TG production rate is expressed as micromoles of triglyceride produced per kilogram of body weight per hour and that of VLDL-apo B in microgram of apo B produced per kilogram of body weight per hour. Data represent means \pm SEM of 5 animals / group.

^ap < 0.01 vs. Group A

^bp < 0.005 vs. Group A

^cp < 0.001 vs. Group A

Figure 4: Pulse-chase analysis of intracellular and secreted apo B. Hepatocytes were pulse-labeled with [³⁵S]-methionine for 1 h and chased for periods of 1, 2, 4 and 16 h in the presence of 10 mmol/L excess cold methionine. ³⁵S-labeled apo B was immunoprecipitated from cell homogenates and from the chase medium and analyzed by SDS-PAGE. The bands corresponding to apo B-100 and apo B-48 were counted after digestion. Values are means \pm SEM for n=5 / group

* p < 0.05 vs. Group A

Figure 5: Microsomal triglyceride transfer protein. Transfer activity was assessed in microsomes isolated from liver homogenates as described in Methods. Data represent means \pm SEM of 5 animals / group.

^ap < 0.006 vs. Group A

^bp < 0.0002 vs. Group A

Figure 6: Activity of GPAT, MGAT and DGAT. As described in Materials and Methods, *Psammomys obesus* liver microsomes were prepared and assayed for the three enzymes. The data represent means \pm SEM for n= 5 / group

^ap < 0.003 vs. Group A

^bp < 0.006 vs. Group A

^cp < 0.002 vs. Group A

Table 1: Hepatic lipid contents in *Psammomys obesus*

Animals	Triglycerides	Cholesterol	Phopholipids
Group A	42.5 ± 5.1	15.0 ± 2.6	76.7 ± 10.7
Group B	392.3 ± 71.2*	33.3 ± 2.7*	106.0 ± 6.6*
Group C	380.6 ± 31.1*	38.3 ± 4.5*	100.7 ± 7.2*

Values are means ± SEM of n=3 / group, expressed as mg/g tissue

*P < 0.05

Table 2: Effects of proteasome inhibitors on VLDL-apo B secretion

	Animal Group		
	A	B	C
Control	1505 ± 293	3629 ± 433 ^b	3221 ± 536 ^{ab}
ALLN	4471 ± 382 ^a	4834 ± 197 ^a	5036 ± 371 ^a
Lactacystin	4380 ± 410 ^a	4902 ± 582	4957 ± 280 ^a

Primary hepatocytes isolated from *Psammomys obesus* liver were pre-incubated with ALLN (40 µg/ml) and lactacystin (1 µM). They were then pulsed with 300 µCi / ml [³⁵S]-methionine for 2h in the presence of the proteasome inhibitors and 0.8 mM oleic acid complexed to albumin. The media samples were submitted to ultracentrifugation. The VLDL samples were reacted with a specific anti-*Psammomys obesus* apo B antibody for 18h at 4°C. At the end of this reaction, Pansorbin was added and the mixture was reincubated at 20°C for 60 min. The immunoprecipitates were washed and analyzed by SDS-PAGE. Bands corresponding to apo B-48 and apo B-100 were sectioned, pooled and counted after an overnight incubation at 20°C with BTS-450 and 10 ml of liquid scintillation fluid.

Values are means ± SEM, expressed as dpm/mg protein for 3 experiments.

^ap < 0.05 VS corresponding control in each group.

^bp < 0.05 VS control of Group A

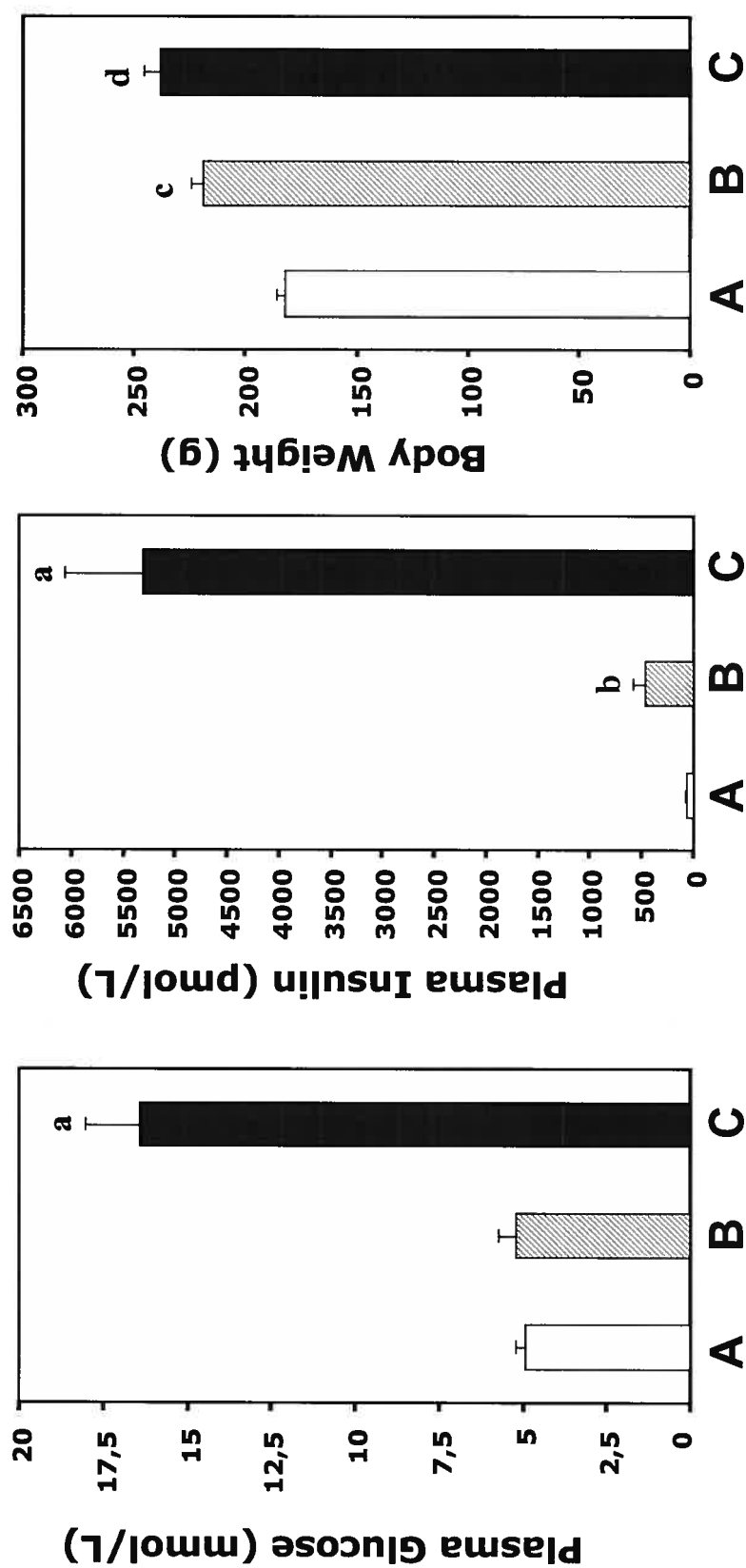
Figure 1

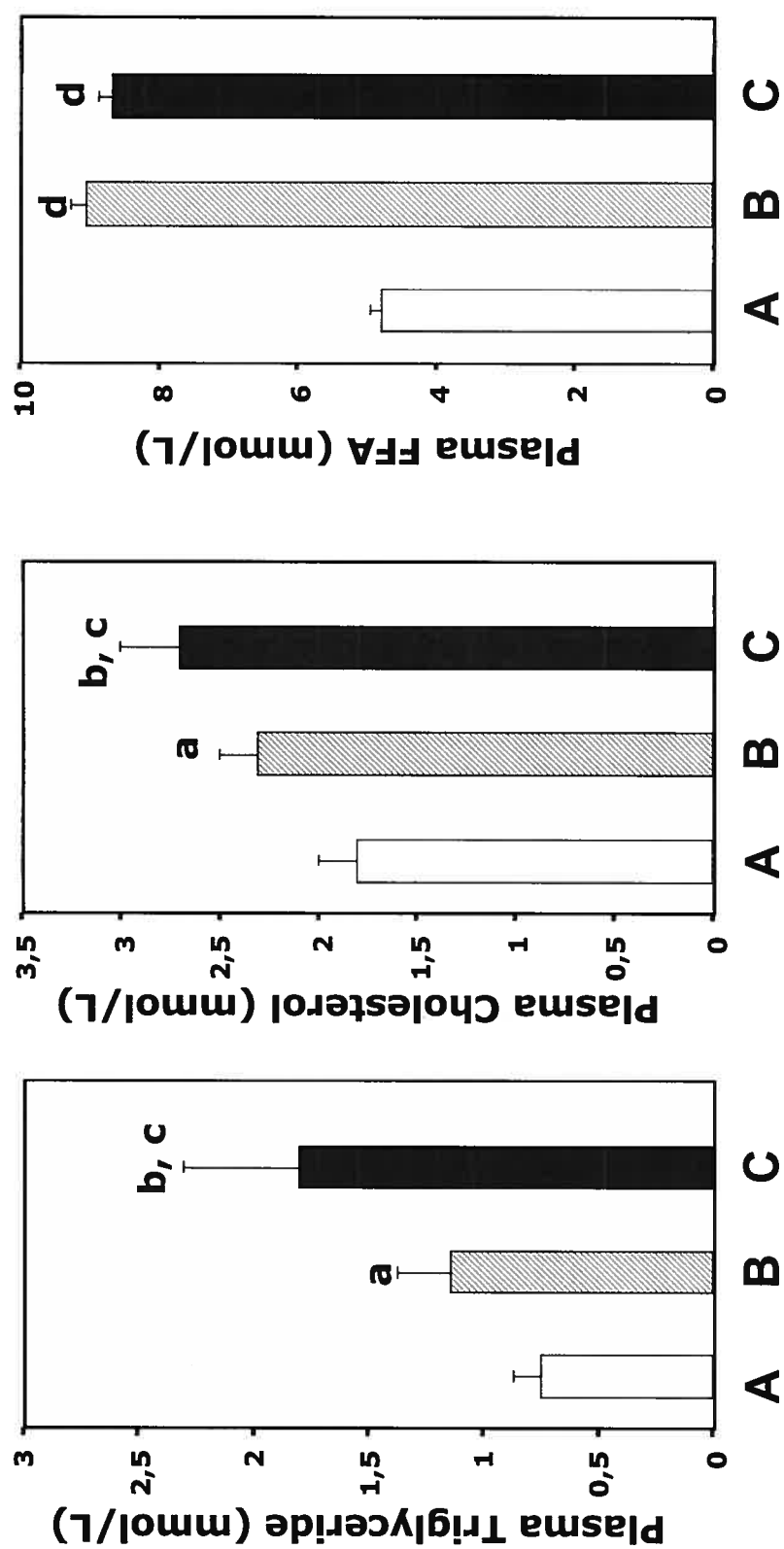
Figure 2

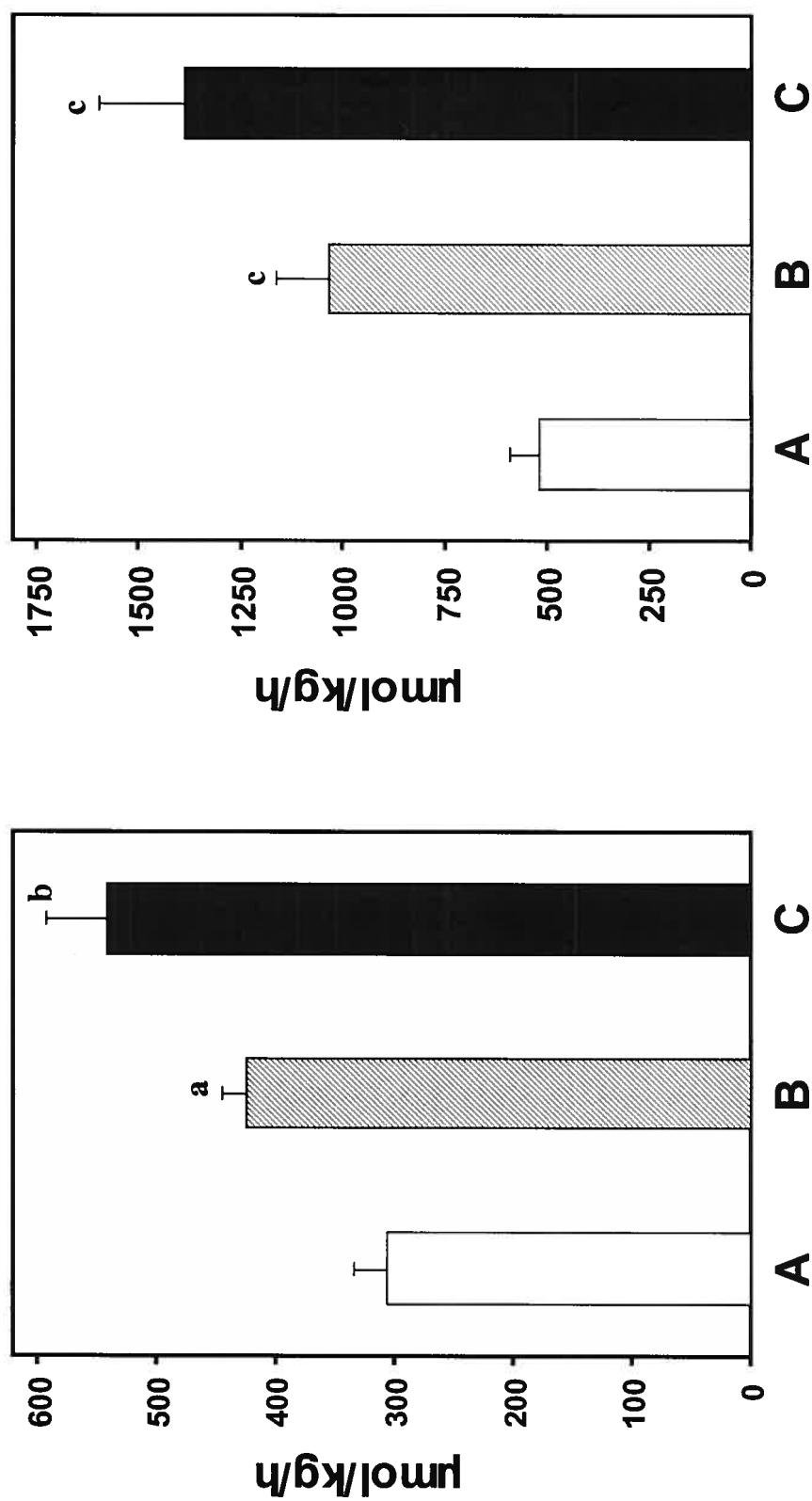
Figure 3

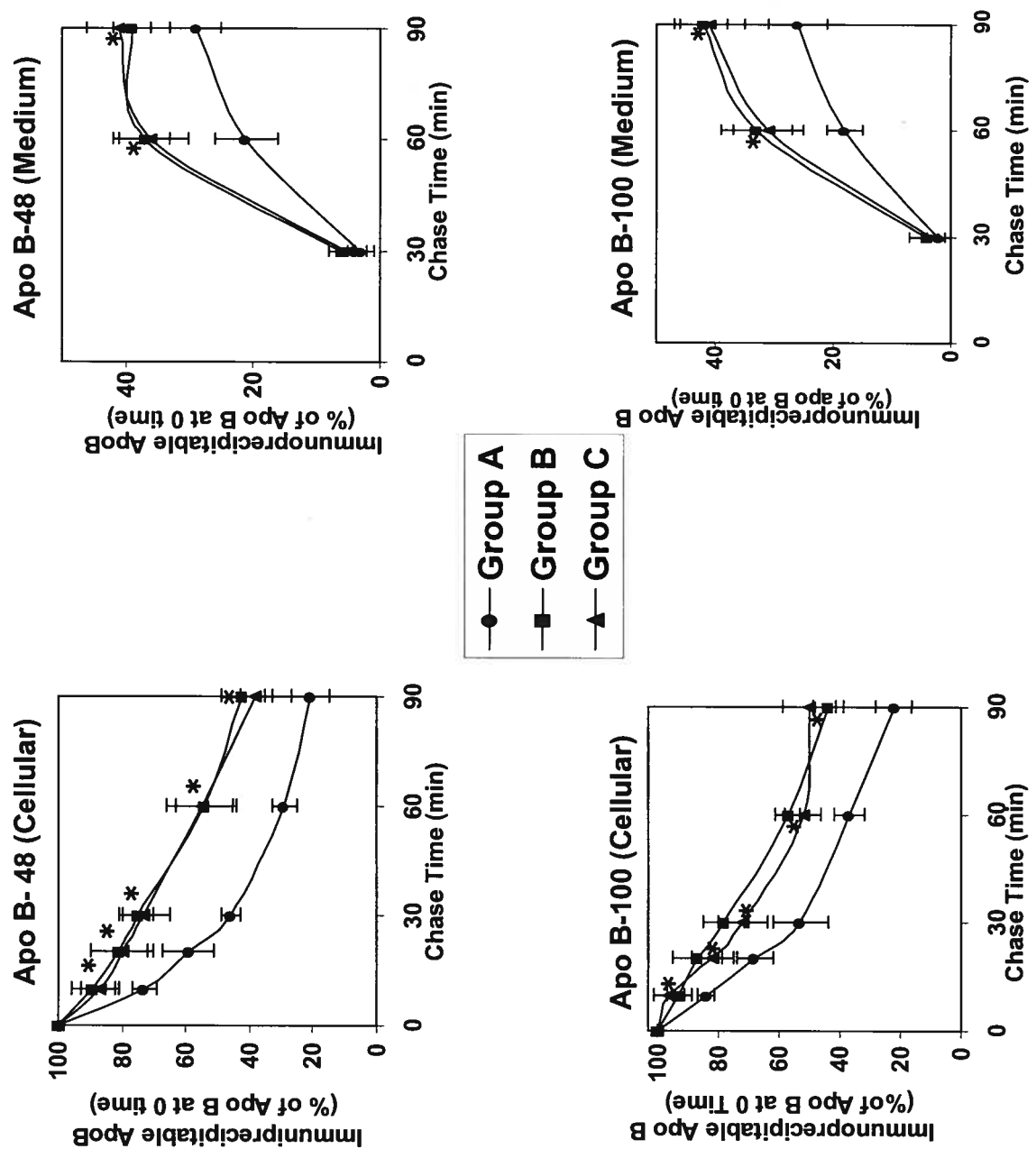
Figure 4

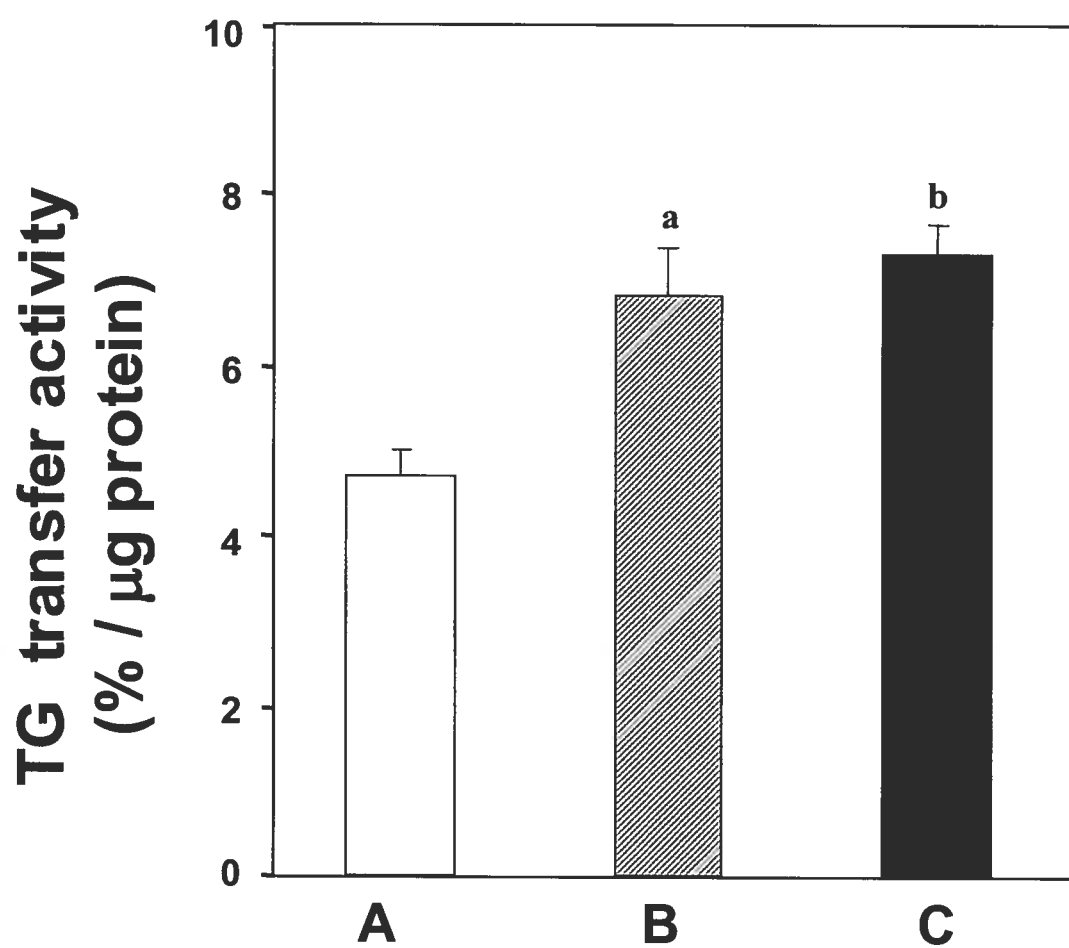
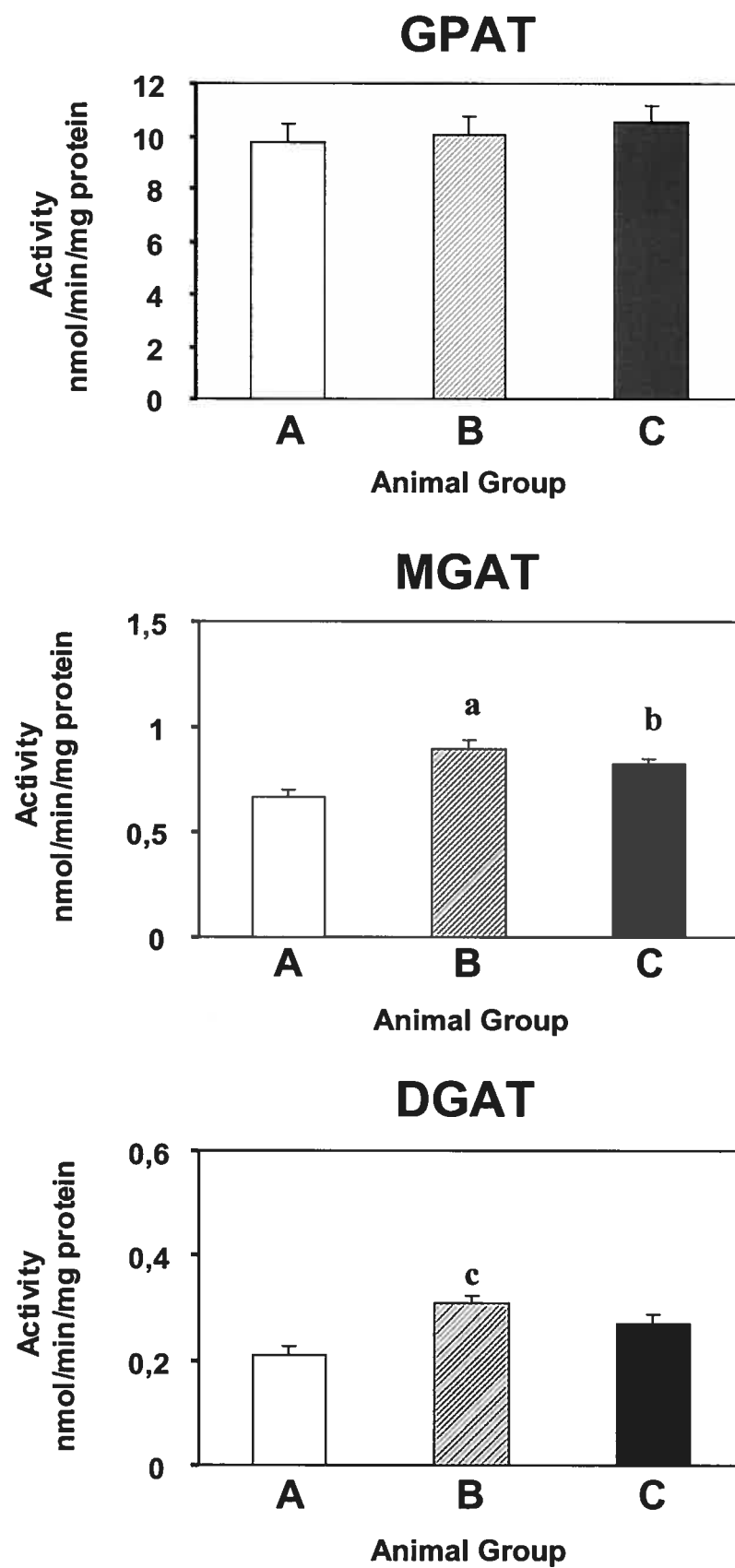
Figure 5

Figure 6

4. Article 3

Article soumis à Diabetes, 2003

INTESTINAL LIPID TRANSPORT IN *PSAMMOMYS OBESUS*, A MODEL OF INSULIN RESISTANCE AND TYPE 2 DIABETES

**Monika Zoltowska^{1,2}, Ehud Ziv⁵, Edgard Delvin^{1,3}, Ronny Kalman⁵,
Carole Garofalo^{1,2}, Ernest Seidman^{1,4} and Emile Levy^{1,2}**

Departments of ²Nutrition, ³Biochemistry and ⁴Pediatrics

¹Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine and
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada
and

⁵Diabetes Unit, Division of Internal Medicine
Hadassah University Hospital
Jerusalem, Israel

Running Title: Overproduction of Intestinal TG-rich Lipoproteins in *Psammomys obesus*

Keywords: Insulin resistance, diabetes, apo B-48, TG-rich lipoprotein, FABP, MTP

Address for Correspondence: Dr. Emile Levy
GI-Nutrition Unit
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec H3T 1C5
Tel.: (514) 345-4626
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

Although postprandial hypertriglyceridemia is a major contributing factor in the development of atherosclerosis, little information is available on the effect of insulin resistance and diabetes on intestinal fat transport. The aim of the present study was to examine intracellular events that govern lipid transport and apo B-48-contained lipoprotein assembly in the small intestine of *Psammomys obesus*, a model of nutritionally induced insulin resistance and type 2 diabetes. Animals with normoglycemia / hyperinsulinemia and hyperglycemia / hyperinsulinemia exhibited high levels of triglycerides (TG) in the plasma and intestine compared with normoglycemic / normoinsulinemic animals. *In vitro* studies, utilizing cultured jejunal explants incubated either with [^{14}C]-oleic acid or [^{35}S]-methionine, revealed their higher efficiency in *de novo* triglyceride synthesis, apo B-48 biogenesis and TG-rich lipoprotein assembly. Accordingly, enhanced monoacylglycerol and diacylglycerol acyltransferase activity was also discernible and concomitant with an increased content of L-fatty acid binding protein (L-FABP). However, both L-FABP amount and apo B-48 proteasomal degradative pathway were decreased. Overall, our findings show that the development of an insulin-resistant / diabetic state in *Psammomys obesus* triggers the whole intra-enterocyte machinery leading to lipoprotein assembly, which favors the intestinal oversecretion of apo B-48-lipoproteins, which may contribute to characteristic hypertriglyceridemia.

INTRODUCTION

Cardiovascular disease remains the most important complication of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) (1, 2). Strong evidence links the increase in diabetic atherosclerosis to dyslipidemia and insulin resistance (3, 4). In fact, disturbed lipid metabolism appears to be a central component of both insulin resistance and diabetes (3, 4). Impaired plasma triglyceride clearance and exaggerated liver very-low density lipoprotein (VLDL) production could represent major pathways of the hypertriglyceridemia that characterizes these two conditions. Indeed, a high plasma triglyceride concentration has been reported in insulin resistance and NIDDM, possibly because of the impaired ability of insulin to inhibit lipolysis and reduce hepatic VLDL secretion (5-8). On the other hand, little information is available on the effect of insulin resistance and diabetes on TG-rich lipoprotein production by the small intestine. Few studies have reported a significant relationship between intestinally derived apolipoprotein (apo) B-48 and the progression of atherosclerosis in non-diabetic (9) and more recently diabetic patients (10). Improved glycemic control also reduced apo B-48 levels (11). Whereas apo B-48-containing intestinally derived lipoproteins seem atherogenic (9), surprisingly data on the contribution of the intestine to hyperlipidemia in insulin resistance and diabetes are rather limited. Technical difficulties have likely hindered progress in this important area for humans. More recently, fructose-fed hamsters have been used as an animal model of insulin resistance and diabetes to investigate the contribution of hepatic and intestinal lipoproteins to dyslipidemia (12). The development of an insulin resistant / hyperinsulinemic state in these hamsters was accompanied by the intestinal overproduction of apo B-48-containing particles (12).

In the present study, we examined whether the development of insulin-resistant and diabetic states lead to the intestinal oversecretion of apo B-48-lipoproteins in *Psammomys obesus*. This desert gerbil shows insulin resistance and develops diet-induced obesity-linked diabetes, initially associated with hyperinsulinemia and gradually progressing to severe hyperglycemia.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Psammomys obesus gerbils (2.5 - 3.5 months old) from the Hebrew University colonies were obtained from Harlan (Jerusalem, Israel). After weaning, *Psammomys obesus* animals were maintained on a low energy diet containing 2.38 kcal/g (Koffolk, Petach Tikva, Israel) until the beginning of the experiments. They were then switched to a high-energy diet (2.93 kcal/g; Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) for 2 weeks. The *Psammomys* gerbils were housed in individual polypropylene cages in a temperature-controlled room with a 12-h light-dark cycle. Water and food were supplied *ad libitum*. Animals were classified into three groups (A, B, C) according to plasma glucose and insulin concentrations. All experimental procedures performed in the study were authorized by the Institutional Animal Care Committee.

Intestinal Organ Cultures

The jejunum from *Psammomys obesus* was cleansed of mesentery, split longitudinally, washed in culture medium, and cut into explants (3x7mm). Five to seven explants were randomly transferred onto lens paper, with the mucosal side facing up in each organ culture dish (Falcon Plastics, Los Angeles, CA). Six dishes were used for each experimental condition. An amount of medium (0.8 ml) sufficient to dampen the lens paper was added. Explants were cultured in serum-free Leibovitz L-15 medium according to the technique described previously (13, 14). After a 30-min stabilization period, the medium was replaced with fresh medium containing a final amount of 1.0 $\mu\text{mol/ml}$ unlabeled oleic acid with 0.5 μCi of [^{14}C]-oleic acid (specific activity, 53.9

mCi/mmol; Amersham Pharmacia Biotech) in a micellar mixture (15). Intestinal explants from *Psammomys obesus* were cultured for 3 h during which the morphological integrity, viability and function of the intestinal explants well all confirmed.

Lipid and Lipoprotein Analyses

Aliquots of explant homogenates and their respective incubation media were lipid extracted with 2:1 (vol/vol) chloroform-methanol (16). Small amounts of lipid standards were added to the samples before the separation of individual lipid classes by one-dimensional thin-layer chromatography (TLC; silica gel from Eastman Kodak, Rochester, NY) as described previously (13, 15, 17). The non-polar solvent system was 80:20:3 (vol/vol/vol) hexane-diethylether-glacial acetic acid. The radioactivity of the separated fractions was measured in a Beckman liquid scintillation spectrometer. Quenching was corrected using computerized curves generated with external standards. An aliquot of the tissue homogenate was used for protein determinations according to Lowry *et al.* (18). For the determination of secreted lipoproteins, the medium supplemented with anti-proteases was first mixed with a plasma lipid carrier (2:0.6 vol/vol) in order to efficiently isolate the *de novo* TG-rich lipoproteins synthesized. The latter were then isolated at a density of 1.006 g/ml by spinning at 100,000 g for 2.26 h with a tabletop ultracentrifuge (Beckman Instruments, Montreal, PQ, Canada) as described previously (13, 14).

Lipid Carrier

To provide a carrier for lipoproteins synthesized *in vitro*, postprandial plasma was obtained from healthy volunteers 3 h after the ingestion of fat (50 g/ 1.73 m²) as described previously (13, 14).

De Novo Apolipoprotein Synthesis

Following incubation with 300 μ Ci [³⁵S]-methionine, jejunal explants were washed (x3) with methionine-free Leibovitz medium and homogenized in phosphate-buffered saline containing 1% (w/vol) Triton X-100, methionine (2mM), phenylmethylsulfonyl fluoride (1mM) and benzamidine (1mM). The homogenates were centrifuged (4°C) at 105,000 g for 60 min and supernatants subsequently reacted with excess apolipoprotein B polyclonal antibodies for 18 h at 4°C. Anti-*Psammomys* apo B antiserum was raised in rabbits. Pansorbin was then added and the mixture was reincubated at 20°C for 60 min. The immunoprecipitates were washed extensively and analyzed by a linear 4-20 % acrylamide gradient preceded by a 3 % stacking gel as described previously (19). Apo B-48 bands on gels were sectioned and counted after an overnight incubation at 20°C with 1 ml BTS-450 (Beckman) and 10 ml of liquid scintillation fluid (Ready Sol. NA, Beckman).

Microsomal Triglyceride Transfer Protein Assays

Intestinal microsomes used as the source of MTP activity were isolated as described previously (15, 20). MTP activity was determined by the transfer of radiolabeled triacylglycerol from donor small unilamellar vesicles (40 nmol of egg phosphatidylcholine, 0.08 nmol of [¹⁴C]-triacylglycerol, 2 nmol of cardiolipin) to

acceptor small unilamellar vesicles (240 nmol of egg phosphatidylcholine, 0.48 nmol of triacylglycerol) at 37°C for 1 h. This assay was previously described in detail (15, 20). Lipid transfer activity is expressed as a percentage of TG transfer per unit time under verified linear assay conditions (first order kinetics). To assess the presence of MTP and evaluate its mass, homogenates of intestinal tissue were prepared for Western blotting as described previously (20). Proteins were separated on a 4-20 % gradient SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Non-specific binding sites of the membranes were blocked using defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed against MTP. The relative amount of primary antibody was detected with Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Blots were developed and the mass of MTP was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software.

Enzymatic Activities

Activities of monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT) were determined in microsomes as reported by Coleman (21).

Protein Mass of I- and L-Fatty Acid Binding Protein

Jejunal explants were homogenized and immunoprecipitated with anti-I-FABP and anti-L-FABP antibodies. The immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane, which was blotted with I-FABP and L-FABP antibodies. Quantitation of I- and L- FABP was carried out as described above.

Biochemical Analyses

Plasma glucose was determined by an enzymatic glucose analyzer and insulin levels were assessed by radioimmunoassay using a human primary antibody (Phadesph; Kabi Pharmacia Diagnostics, Sweden). Plasma triglyceride and cholesterol levels were measured colorimetrically (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany).

Statistical Analysis

Data were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) to assess differences in the parameters studied. Differences between mean values were evaluated by the student's two tailed t-test.

RESULTS

Body Weight and Biochemical Parameters

As expected, genetically predisposed *Psammomys obesus* on an affluent laboratory rodent diet higher in energy than the desert native food displayed the three characteristic patterns of normoinsulinemia / normoglycemia (Group A), hyperinsulinemia / normoglycemia (Group B) and hyperinsulinemia / hyperglycemia (Group C) (Figure 1). Furthermore, the latter two animal groups exhibited moderate weight gain (Figure 1) as well as hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia (Figure 2). These abnormalities are accompanied with insulin resistance according to several previous studies (22-25).

Intestinal Lipid Content

The profile of triglyceride and cholesterol in intestinal tissue was determined in *Psammomys obesus* animals. Lipid analysis revealed higher levels of triglycerides in Groups B and C than in Group A. Although cholesterol fractions were also increased in Groups B and C, statistical significance was reached only for total cholesterol and free cholesterol in Group C compared with Group A.

De Novo Lipid Synthesis and Status of Monoacylglycerol (MGAT) and Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT) Activities

We measured the activity of MGAT and DGAT in order to evaluate the effect of insulin resistance and diabetes on the major enzymatic machinery involved in triacylglycerol formation in the intestine. As observed in Figure 4, MGAT and DGAT

activity was elevated in Groups B and C as compared with Group A. Accordingly, the esterification of [^{14}C]-oleic acid into complex lipid fractions in jejunal explants of Groups B and C exceeded that of Group A (Figure 5). Likewise, the release of labeled triglycerides, phospholipids and cholesteryl esters into the medium was higher in Groups B and C than in Group A animals. The current findings suggest that insulin resistance and diabetes enhanced the intestine's ability to produce lipids in *Psammomys obesus*.

Apo B-48 Biogenesis and TG-rich Lipoprotein Assembly

The synthesis of apo B was determined in jejunal explants in culture (Figure 6). As evidenced by [^{35}S]-methionine incorporation, apo B-48 synthesis was significantly increased in the intestine of Groups B and C relative to that of Group A ($p < 0.02$). With labeled oleic acid used as a substrate, our data revealed significantly ($p < 0.01$) more output of TG-rich lipoproteins in Groups B and C than in Group A (Figure 7). Overall, our observations suggest that the development of insulin resistance and diabetes in *Psammomys obesus* stimulated the intestinal transport of lipids by augmenting apo B-48 synthesis and TG-rich lipoprotein assembly and secretion.

Microsomal Triglyceride Transfer Protein

Since MTP is necessary for the efficient assembly of TG-rich lipoproteins, we assessed MTP activity and protein expression in the intestine of *Psammomys obesus*. There were no differences in MTP activity and protein expression among Groups A, B and C (Figure 8). Our results, therefore, suggest that MTP does not play a role in the intestinal overproduction of TG-rich lipoprotein observed in insulin-resistant and diabetic *Psammomys obesus* animals.

Fatty Acid Binding Protein

The next set of experiments was designed to examine the protein expression of the two distinct I- and L-FABP in the intestine in the various *Psammomys obesus* groups. The effect of insulin resistance or diabetes was noted on the abundance of I-FABP, whereas levels of L-FABP were higher in Groups B and C than in Group A (Figure 9). This suggests a relationship between the magnitude of L-FABP and the increase in intestinal lipid transport in insulin resistance and diabetes.

DISCUSSION

Hypertriglyceridemia is very common in diabetes and substantially increases the risk of cardiovascular diseases (26). Similarly, insulin resistance is associated with elevated plasma triglycerides and predisposes for cardiovascular complications. Although the regulation of circulating TG-rich lipoproteins is extremely complex in diabetes and insulin resistance, many studies consider increased hepatic VLDL secretion and impaired VLDL clearance mechanisms for dyslipidemia (5-8). It is postulated that the overall effect of insulin resistance and diabetes on VLDL production reflects raised fatty acid flux to the liver (7). Consequently, there is a stimulation of the assembly and output of apo B-100-containing lipoproteins (7, 27). The aim of our investigation was to examine whether intestinal TG metabolism is also altered in *Psammomys obesus* animals that are characterized by insulin resistance and diabetes. We demonstrated that the development of the insulin resistant/diabetes state is accompanied with (a) an intestinal increase in lipid content and *de novo* triglyceride synthesis concomitant with an increased amount of L-FABP and decreased levels of I-FABP; (b) augmented MGAT and DGAT activity, two enzymes that belong to the primary triacylglycerol synthesis pathway in enterocytes; (c) elevated apo B-48 biogenesis, probably resulting from reduced proteasomal degradation; (d) stimulated TG-rich lipoprotein assembly; and (e) unaltered MTP activity and protein expression.

Triacylglycerol biosynthesis in the intestine is believed to occur mainly through the monoacylglycerol pathway. Initially, monoacylglycerol and fatty acyl CoA are covalently joined to form diacylglycerol in a reaction catalyzed by MGAT (28, 29). Then, diacylglycerol and fatty acyl CoA are used to synthesize triacylglycerol in a

reaction catalyzed by DGAT (28, 30). In our study, measurement of MGAT and DGAT disclosed a high activity level, which is consistent with the remarkable capacity of the small intestine to produce triacylglycerol in an insulin-resistant and diabetic state. Physiologically, the present findings reflect the intestine's attempt to enhance lipid production under insulin resistance and diabetes conditions. It is generally accepted that the intracellular mechanism of TG-rich lipoprotein assembly requires apo B synthesis and association (31, 32). The early step in this process is the co-translational lipidation of apo B that is transiently bound to the endoplasmic reticulum membrane where it is folded. The addition of lipids stabilizes apo B and prevents its proteolytic degradation via the ubiquitin-dependent proteasomal pathway (33-35). It is, therefore, reasonable to suggest that the augmented synthesis of triglycerides in the small intestine of *Psammomys obesus* insulin-resistant and diabetic animals enhanced apo B-48 protection from misfolding and degradation, resulting in the marked secretion of apo B-48-containing TG-rich lipoproteins. Our data argue for an increased efficiency of intestinal TG-rich lipoprotein assembly and secretion and resemble recent observations in fructose-fed hamsters exhibiting chronic hyperinsulinemia and insulin resistance while displaying a significant stability enhancement of newly synthesized apo B with only a minor fraction being sorted to intracellular degradation (12).

MTP is a resident protein in the lumen of the ER, which facilitates the transfer of lipids from their site of synthesis in the ER membrane into the lumen during the assembly of TG-rich lipoproteins (36-38). MTP mutations in abetalipoproteinemia provoke abnormally reduced lipid transport and defects in the production of TG-rich lipoproteins (37-39). Similarly, heterozygous MTP knockout mice, expressing half-normal levels of MTP, showed a considerable reduction in plasma apo B-100 levels

(40). Conversely, MTP overexpression in the liver of transgenic mice resulted in a significantly increased secretion of VLDL apo B and triglyceride (41). However, the MTP requirement for the export of apo B-48 remains controversial. Recent studies have stressed that liver-specific MTP knockout mice still secrete apo B-48, thus excluding the obligatory role of MTP (42, 43). Our findings show that *Psammomys obesus* enterocytes are capable of releasing more TG-rich lipoproteins in insulin-resistant and diabetic states without augmenting MTP activity or protein expression. Additional work is necessary to delineate the role of MTP in apo B-48 delivery, particularly in insulinemic and diabetic states in view of conflicting data reported in various animal models (12, 44).

Fatty acid binding proteins (FABP) are another set of proteins critical to the transport of fatty acids (FA) in the enterocyte (45). Based on a variety of physico-chemical studies, different functions have been proposed for cytosolic FABPs, including FA transport and compartmentalization, the modulation of enzyme activities involved in lipid metabolism, and the protection of cellular integrity from the detrimental effects of hydrophobic FA or other noxious substances (46-48). The physiological significance of the presence of the two FABP forms (L- and I-FABP) in intestinal absorptive cells remains unknown. Present data show a relationship between endogenous L-FABP and TG-rich lipoprotein secretion, both of which are induced in the small intestine of insulin-resistant and diabetic *Psammomys obesus*. On the other hand, I-FABP protein expression appears to be decreased and uncoupled with the stimulated intestinal lipid transport in insulin-resistant and diabetic *Psammomys obesus* animals. Accordingly, recent studies in mice have suggested that I-FABP is not essential for dietary fat absorption (49) and its overexpression may even limit intestinal lipid transport as noted

in Caco-2 cells (50, 51). On the basis of these observations, we suggest that insulin-resistant and diabetes conditions may induce L-FABP that may be involved in the specific targeting of FA to the synthetic pathway, thereby stimulating lipid esterification and TG-rich lipoprotein assembly.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (MT-10583) and by research scholarship awards from the *Fonds de la Recherche en santé du Québec* awarded to Emile Levy and Ernest Seidman. We also acknowledge the expert secretarial assistance of Schohraya Spahis.

REFERENCES

1. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D: Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16:434-444, 1993
2. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M: Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339:229-234, 1998
3. Beckman JA, Creager MA, Libby P: Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287:2570-2581, 2002
4. Reaven GM: Multiple CHD risk factors in type 2 diabetes: beyond hyperglycaemia. *Diabetes Obes Metab* 4 Suppl 1:S13-S18, 2002
5. Howard BV: Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 84:28J-32J, 1999
6. Coppack SW: Postprandial lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 14 Suppl 3:S67-S74, 1997
7. Ginsberg HN: Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 106:453-458, 2000
8. Malmstrom R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Jarvinen H, Shepherd J, Taskinen MR: Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* 40:454-462, 1997
9. Karpe F, Steiner G, Uffelman K, Olivecrona T, Hamsten A: Postprandial lipoproteins and progression of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 106:83-97, 1994

10. Mero N, Malmstrom R, Steiner G, Taskinen MR, Syvanne M: Postprandial metabolism of apolipoprotein B-48- and B-100-containing particles in type 2 diabetes mellitus: relations to angiographically verified severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 150:167-177, 2000
11. Phillips C, Murugasu G, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH: Improved metabolic control reduces the number of postprandial apolipoprotein B-48-containing particles in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 148:283-291, 2000
12. Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelman KD, Kohen-Avramoglu R, Lewis GF, Adeli K: Fasting and Postprandial Overproduction of Intestinally Derived Lipoproteins in an Animal Model of Insulin Resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal *de novo* lipogenesis and apo B-48-containing lipoprotein. *J Biol Chem* 277:31646-31655, 2002
13. Levy E, Thibault L, Menard D: Intestinal lipids and lipoproteins in the human fetus: modulation by epidermal growth factor. *J Lipid Res* 33:1607-1617, 1992
14. Levy E, Menard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, Ziv E, Feoli-Fonseca JC, Seidman E: The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem* 276:39679-39684, 2001
15. Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, Bendayan M, Roy CC: Intestinal apo B synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res* 28:1263-1274, 1987
16. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol chem.* 226:497-509, 1957

17. Levy E, Beaulieu JF, Delvin E, Seidman E, Yotov W, Basque JR, Menard D: Human crypt intestinal epithelial cells are capable of lipid production, apolipoprotein synthesis, and lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 41:12-22, 2000
18. Lowry OH, Rosebrough A, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
19. Levy E, Sinnett D, Thibault L, Nguyen TD, Delvin E, Menard D: Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Lett* 393:253-258, 1996
20. Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, Bendayan M: Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 277:16470-16477, 2002
21. Coleman RA: Diacylglycerol acyltransferase and monoacylglycerol acyltransferase from liver and intestine. *Methods Enzymol.* 209:98-104, 1992
22. Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, Hansen LL, Busch AK, Hansen BF, Shafrir E, Mosthaf-Seedorf L: Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in Psammomys obesus: overexpression of protein kinase Cepsilon in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes* 50:584-592, 2001
23. Shafrir E, Ziv E, Saha AK, Ruderman NB: Regulation of muscle malonyl-CoA levels in the nutritionally insulin-resistant desert gerbil, Psammomys obesusdagger. *Diabetes Metab Res Rev* 18:217-223, 2002

24. Walder K, McMillan J, Lapsys N, Kriketos A, Trevaskis J, Civitarese A, Southon A, Zimmet P, Collier G: Calpain 3 gene expression in skeletal muscle is associated with body fat content and measures of insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26:442-449, 2002
25. Kalman R, Ziv E, Shafrir E, Bar-On H, Perez R: Psammomys obesus and the albino rat--two different models of nutritional insulin resistance, representing two different types of human populations. *Lab Anim* 35:346-352, 2001
26. Fontbonne A, Eschwege E, Cambien F, Richard JL, Ducimetiere P, Thibault N, Warnet JM, Claude JR, Rosselin GE: Hypertriglyceridaemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. Results from the 11-year follow-up of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 32:300-304, 1989
27. Dixon JL, Ginsberg HN: Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J Lipid Res* 34:167-179, 1993
28. Tso P, Crissinger K: Biochemical and Physiological aspects of human nutrition. Stipanuk MH, Ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 2000, p. 125-141
29. Levy E, Mehran M, Seidman E: Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 9:626-635, 1995
30. Cases S, Stone SJ, Zhou P, Yen E, Tow B, Lardizabal KD, Voelker T, Farese RV Jr.: Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem* 276:38870-38876, 2001
31. Herbert PN, Assmann G, Gotto AMJ, Frederickson DS: Familial lipoprotein deficiency: abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia, and tangier disease. In

- The metabolic basis of inherited disease. Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS, Goldstein JL, Brown MS, Eds. New York: McGraw-Hill, 1983, p. 589-621
32. Levy E: The genetic basis of primary disorders of intestinal fat transport. *Clin Invest Med* 19:317-324, 1996
 33. Yeung SJ, Chen SH, Chan L: Ubiquitin-proteasome pathway mediates intracellular degradation of apolipoprotein B. *Biochemistry* 35:13843-13848, 1996
 34. Fisher EA, Zhou M, Mitchell DM, Wu X, Omura S, Wang H, Goldberg AL, Ginsberg HN: The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin- proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *J Biol Chem* 272:20427-20434, 1997
 35. Chen Y, Le Caherec F, Chuck SL: Calnexin and other factors that alter translocation affect the rapid binding of ubiquitin to apoB in the Sec61 complex. *J Biol Chem* 273:11887-11894, 1998
 36. Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil CM, Turck CW, Bouma ME, Rader DJ: Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature* 365:65-69, 1993
 37. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE: Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 258:999-1001, 1992
 38. Wetterau JR, Zilversmit DB: A triglyceride and cholesteryl ester transfer protein associated with liver microsomes. *J Biol Chem* 259:10863-10866, 1984

39. Shoulders CC, Brett DJ, Bayliss JD, Narcisi TM, Jarmuz A, Grantham TT, Leoni PR, Bhattacharya S, Pease RJ, Cullen PM: Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum Mol Genet* 2:2109-2116, 1993
40. Leung GK, Veniant MM, Kim SK, Zlot CH, Raabe M, Bjorkegren J, Neese RA, Hellerstein MK, Young SG: A deficiency of microsomal triglyceride transfer protein reduces apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem* 275:7515-7520, 2000
41. Tietge UJ, Bakillah A, Maugeais C, Tsukamoto K, Hussain M, Rader DJ: Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B. *J Lipid Res* 40:2134-2139, 1999
42. Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL, Young SG: Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 95:8686-8691, 1998
43. Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, Wong JS, Hamilton RL, Young SG: Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin. Invest* 103:1287-1298, 1999
44. Hayashi H, Sato Y, Kanai S, Ichikawa M, Funakoshi A, Miyasaka K: Increased lymphatic lipid transport in genetically diabetic obese rats. *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 282:G69-G76, 2002

45. Davidson NO, Magun AM: In Textbook of gastroenterology. Yamada T, Alpers DH, Owyang C, Powell DW, Silverstain FE, Eds. Lippincott, Philadelphia, 1993, p. 428-455
46. Thomson AB, Dietschy IM: In Physiology of the gastrointestinal tract. Johnson LR, Ed. New York, Raven Press, 1981, p. 1147
47. O'Doherty PJ, Kuksis A: Stimulation of triacylglycerol synthesis by Z protein in rat liver and intestinal mucosa. *FEBS Lett* 60:256-258, 1975
48. Bordewick U, Heese M, Borchers T, Robenek H, Spener F: Compartmentation of hepatic fatty-acid-binding protein in liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis. *Biol Chem Hoppe Seyler* 370:229-238, 1989
49. Vassileva G, Huwyler L, Poirier K, Agellon LB, Toth MJ: The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J* 14:2040-2046, 2000
50. Gedde-Dahl A, Kulseth MA, Ranheim T, Drevon CA, Rustan AC: Reduced secretion of triacylglycerol in CaCo-2 cells transfected with intestinal fatty acid-binding protein. *Lipids* 37:61-68, 2002
51. Darimont C, Gradoux N, Persohn E, Cumin F, De Pover A: Effects of intestinal fatty acid-binding protein overexpression on fatty acid metabolism in Caco-2 cells. *J Lipid Res* 41:84-92, 2000

LEGENDS

Figure 1: Body weight, plasma glucose and insulin concentrations in *Psammomys obesus*. When given free access to laboratory diet, *Psammomys obesus* displays heterogeneous glucose and insulin levels, ranging from animals with normoglycemia and normoinsulinemia to obese diabetic animals with hyperglycemia and hyperinsulinemia.

Values are means \pm SEM for n=10 in Group A, n=8 in Group B and n=7 in Group C

Figure 2: Plasma lipid concentrations of the three *Psammomys obesus* groups.

Values are means \pm SEM for n=6 in Group A, n=8 in Group B and n=6 in Group C

Figure 3: Lipid content in *Psammomys obesus* intestinal tissue. Intestinal tissue from the three *Psammomys* groups was homogenized and lipids were extracted by chloroform / methanol (2:1, v/v). Following isolation by TLC, triglyceride and cholesterol fractions were quantitated as described in Methods.

Values are means \pm SEM for n=6 in Group A, n=8 in Group B and n=6 in Group C

Figure 4: MGAT and DGAT activity in the small intestine of *Psammomys obesus*. Microsomes are prepared from the intestinal tissue of the three *Psammomys obesus* groups and assayed for the two enzymes.

Data represent means \pm SEM for n=6 in Group A, n=8 in Group B and n=6 in Group C

Figure 5: *De novo* lipid synthesis and secretion in *Psammomys obesus* intestinal explants. Jejunal explants were incubated with [14 C] oleic acid substrate for 3 hours. Lipids of tissue homogenates and media were then extracted with chloroform-methanol (2:1, v/v), isolated by TLC, and quantitated as described in Methods.

Values represent means \pm SEM of three separate experiments.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$

Figure 6: Apo B-48 synthesis in *Psammomys obesus* intestinal explant. Jejunal explants were incubated for 3 hours with methionine-free medium containing [35 S]-methionine in the presence (Panel A) or absence (Panel B) of proteasome inhibitors. Apo B-48 was then immunoprecipitated and analyzed by gel electrophoresis.

Values represent means \pm SEM of three separate experiments.

* $p < 0.02$

Figure 7: Production of TG-rich lipoproteins by jejunal explants of *Psammomys obesus*. Jejunal explants were cultured in the presence of [14 C] oleic acid. After 3 hours of incubation, TG-rich lipoproteins were isolated by ultracentrifugation.

Values are means \pm SEM of three separate experiments.

* $p < 0.01$

Figure 8: MTP activity and protein expression in *Psammomys obesus* intestine. Intestinal tissue from the three groups of *Psammomys obesus* was prepared for the determination of MTP activity and analysis (upper panel) by Western blot (lower panel). Values for TG / transfer are means \pm SEM for n=6-8 / group. Data from a representative experiment of Western blot are illustrated in the lower panel.

Figure 9: Western blot analysis of *Psammomys obesus* intestine expressing I-FABP and L-FABP. Protein expression was examined by Western blotting and hybridization. Values are means \pm SEM of three separate experiments.

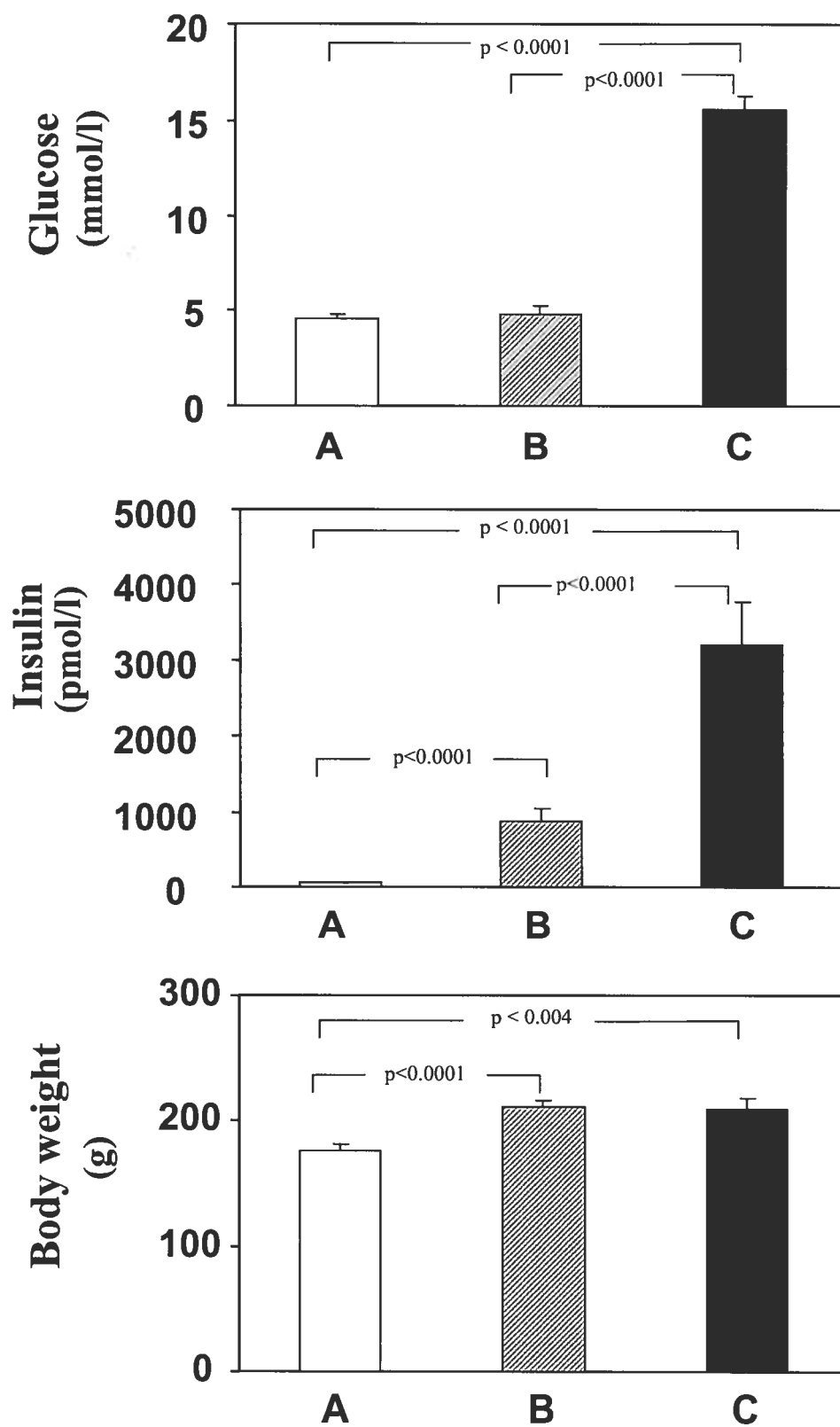
Figure 1

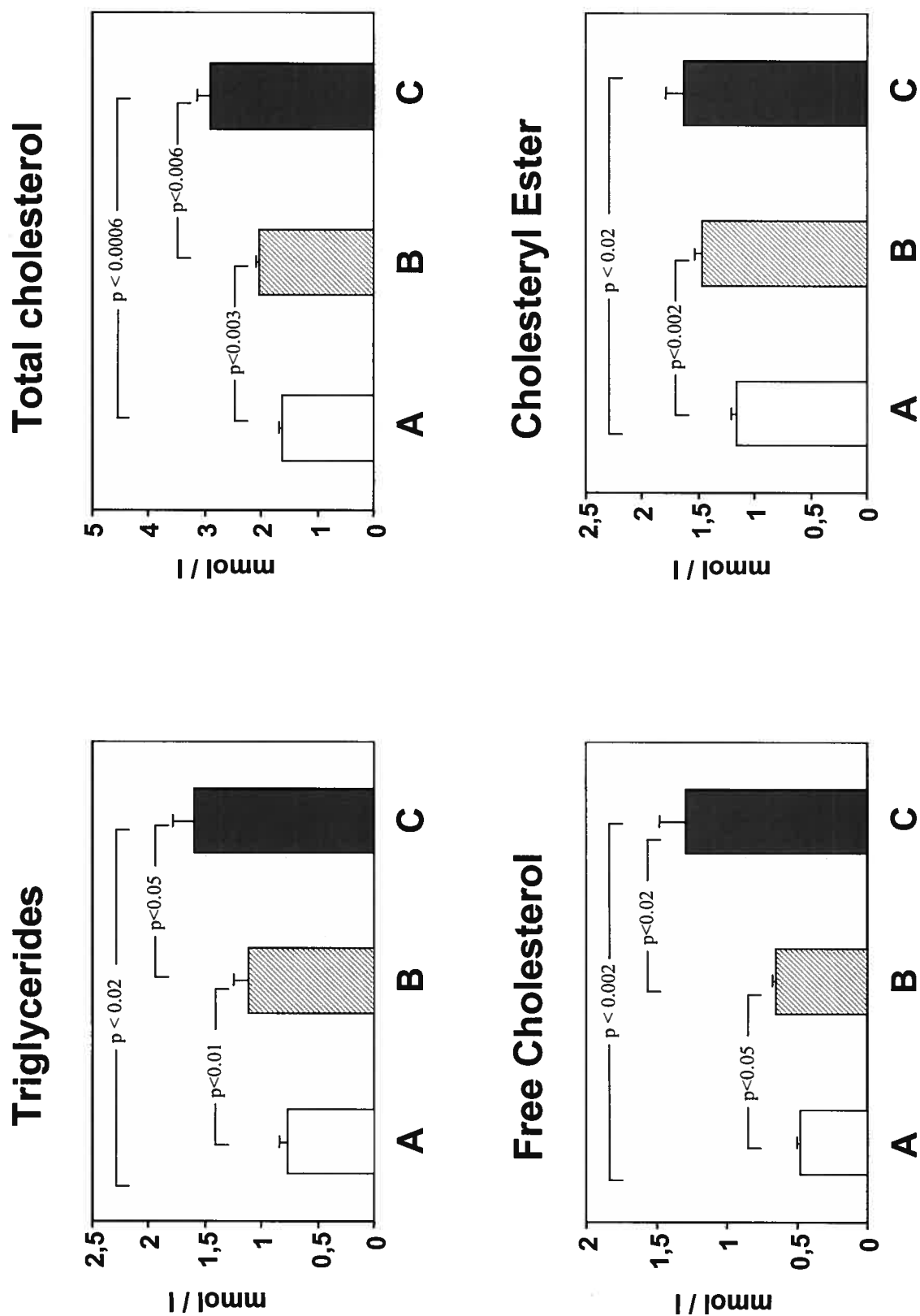
Figure 2

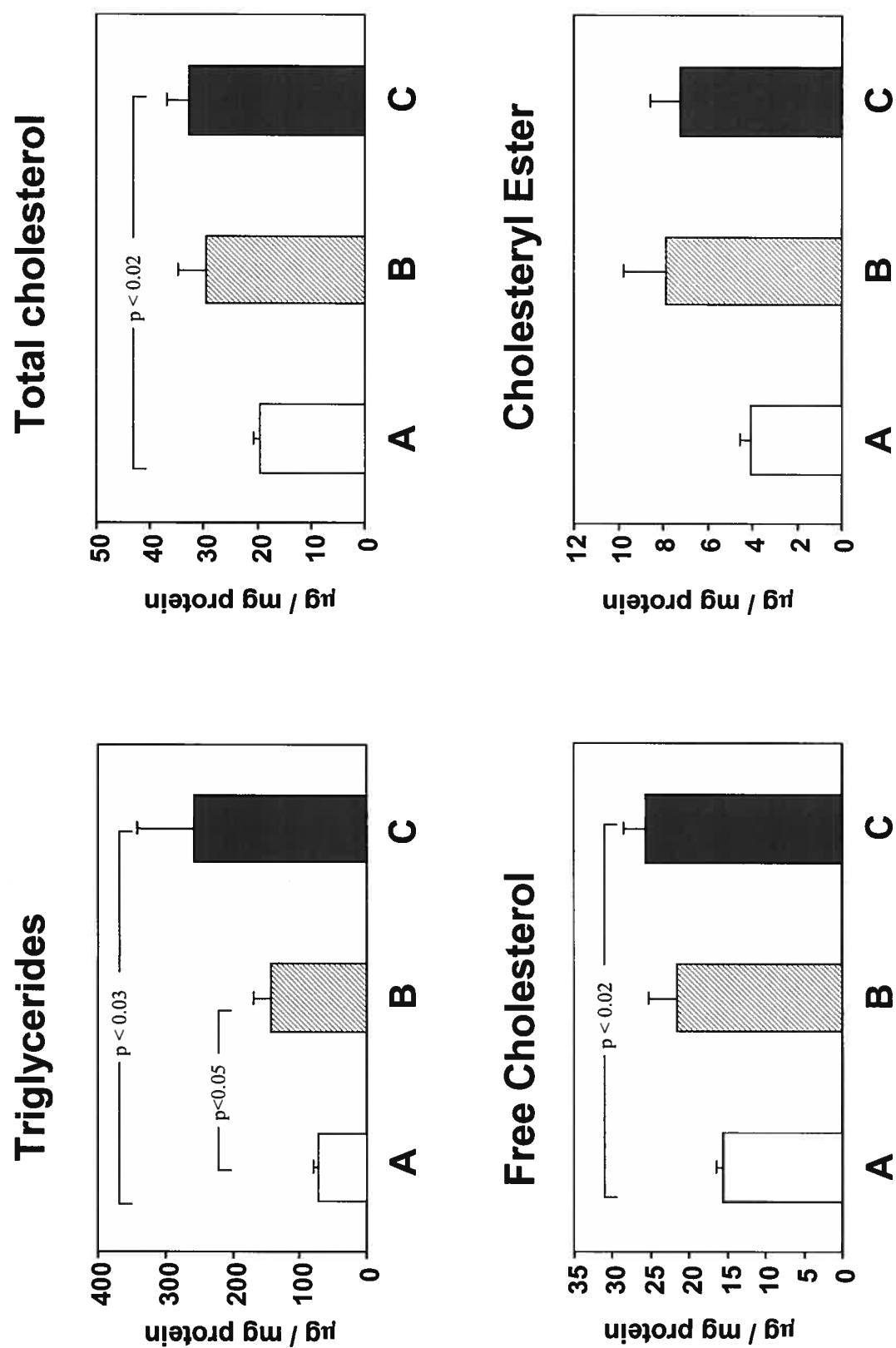
Figure 3

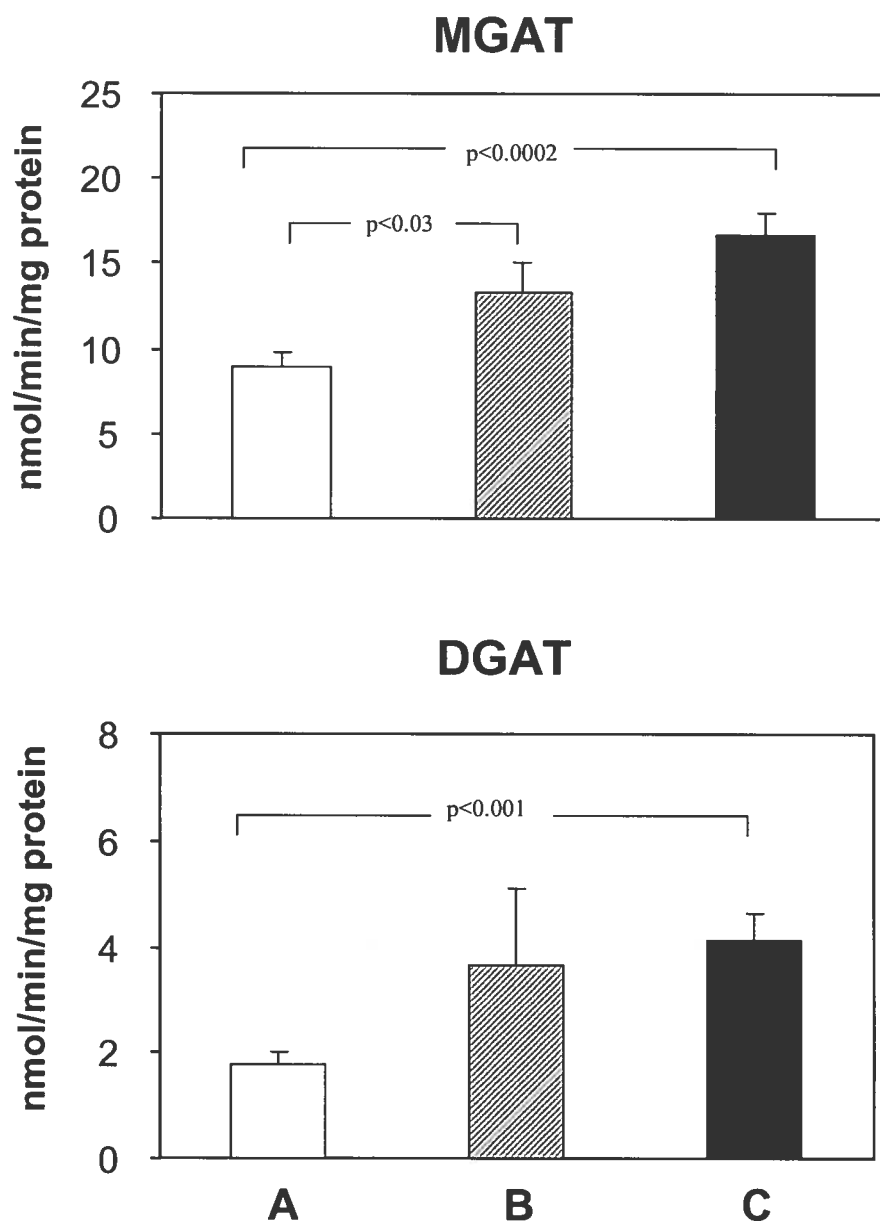
Figure 4

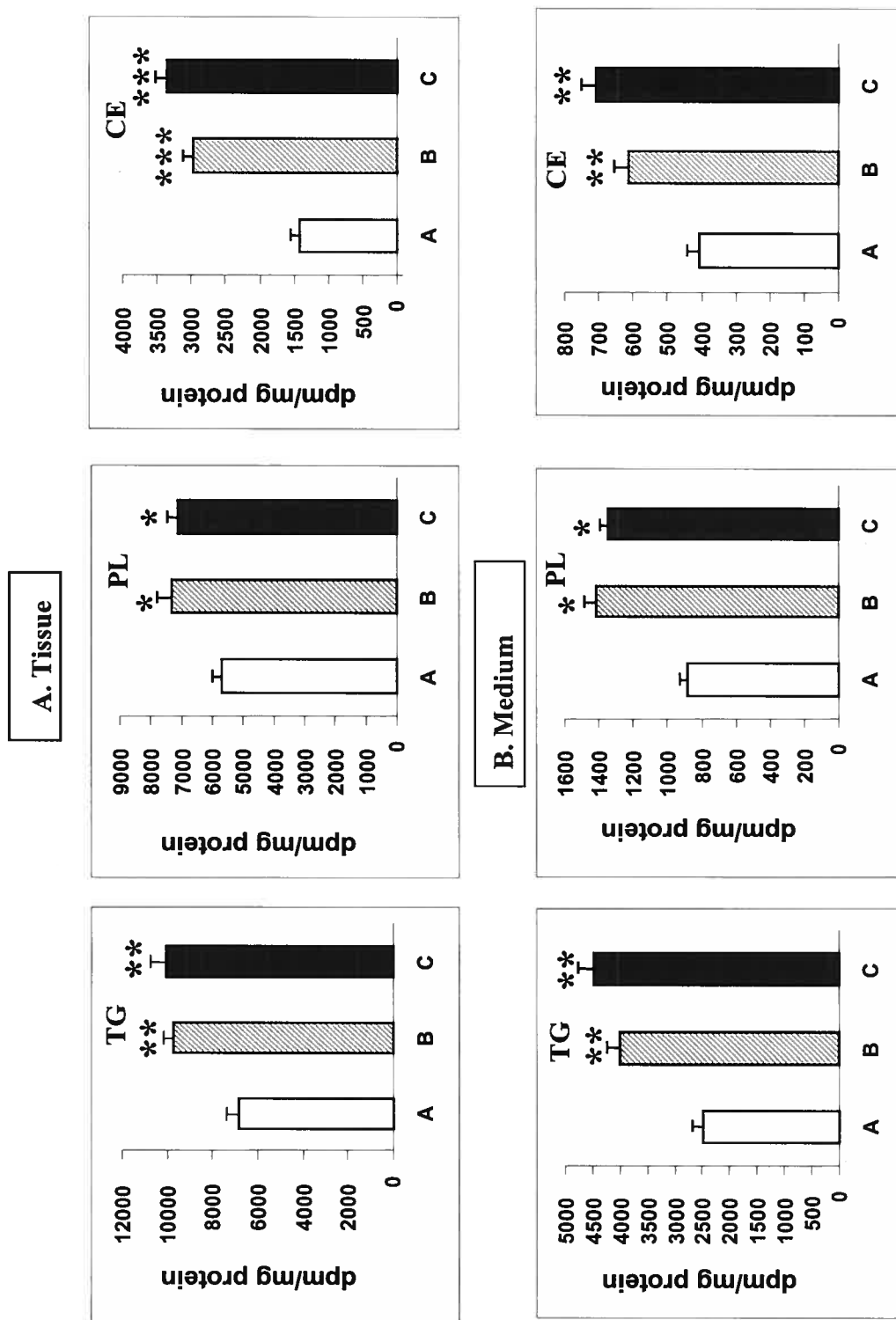
Figure 5

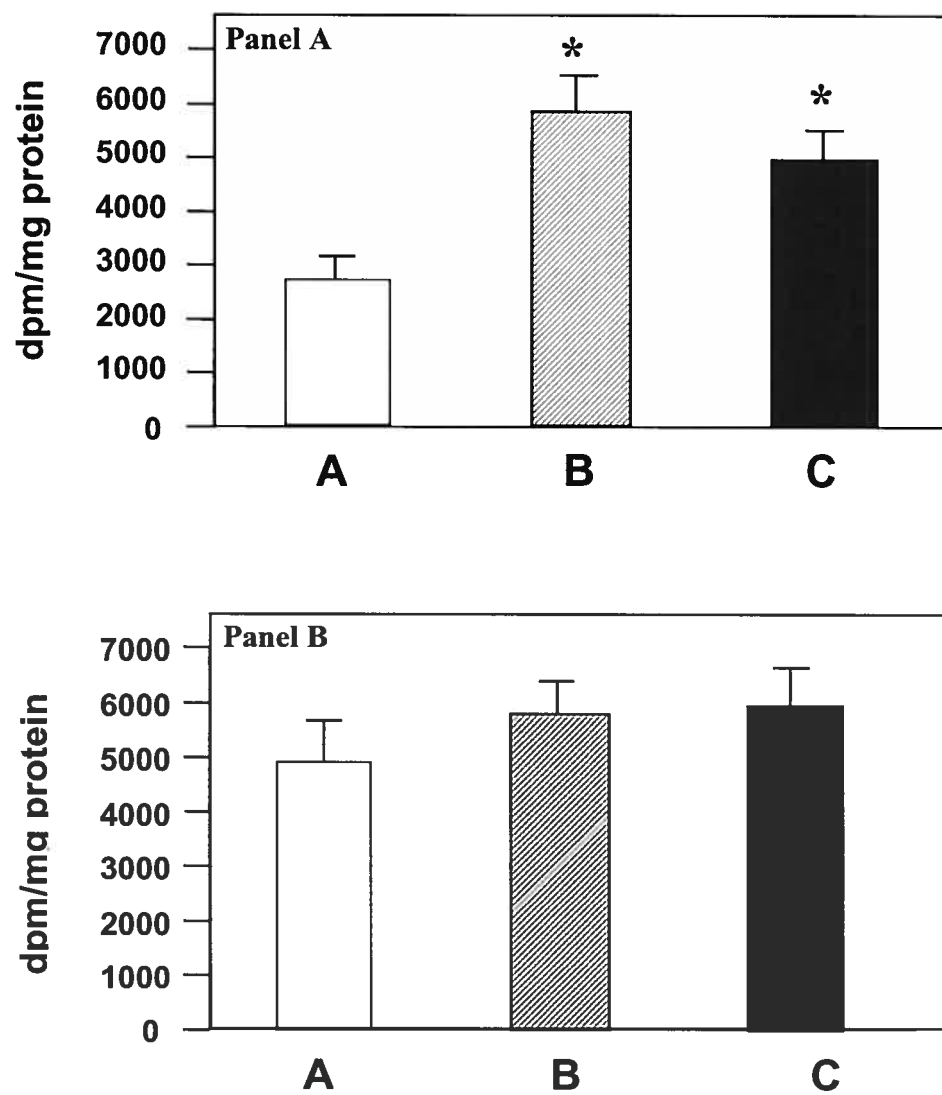
Figure 6**Biogenesis**

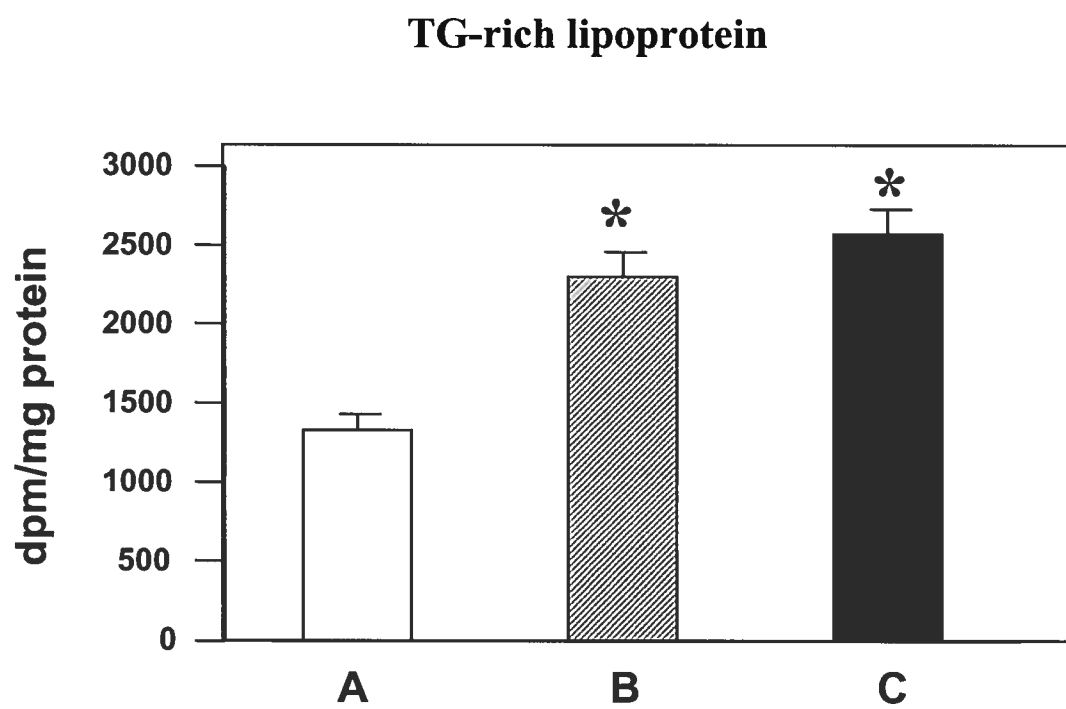
Figure 7

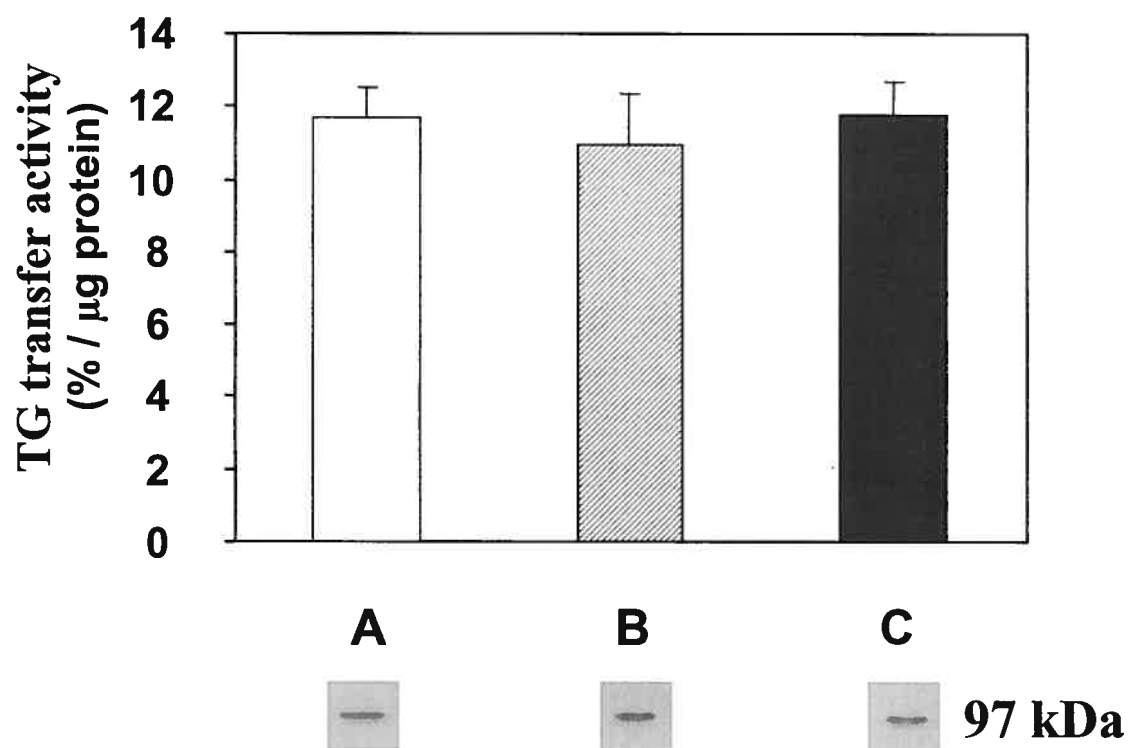
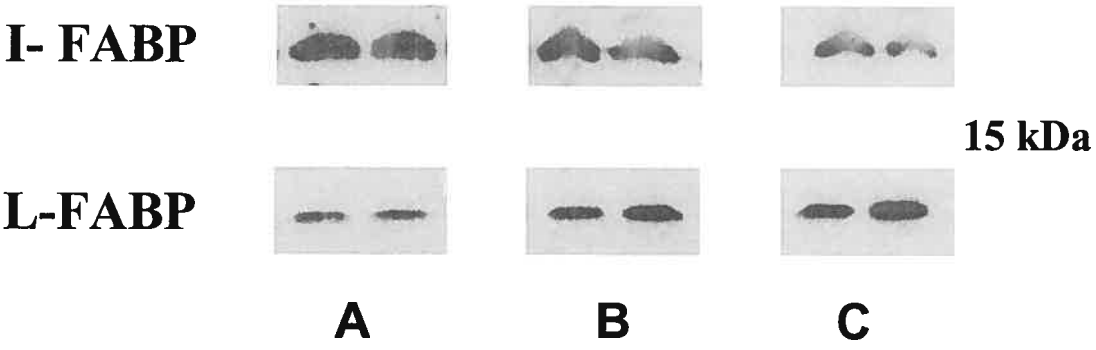
Figure 8

Figure 9



5. Article 4

Article soumis à Life Sciences, 2003

**Impact of *In vivo* Glycation of LDL on Platelet Aggregation and Monocyte
Chemotaxis in Diabetic *Psammomys Obesus***

Monika Zoltowska^{1,2}, Ehud Ziv⁴, Edgard Delvin^{1,3} and Emile Levy^{1,2}

¹Centre de Recherche Hôpital Sainte-Justine, Departments of ²Nutrition and
³Biochemistry, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5
and

⁴Diabetes Unit, Division of Internal Medicine, Hadassah University Hospital, Jerusalem
91120, Israel

Address correspondence to:

Dr. Emile Levy
Centre de recherche
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5
Tel.: (514) 345-4626
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [REDACTED]

Section Heading: Cardiovascular and Autonomic Mechanisms

ABSTRACT

Psammomys obesus rat is an appropriate model to highlight the development of hyperinsulinemia, insulin resistance, obesity and diabetes. This animal species, with genetically predetermined diabetes, acquires NIDDM when exposed to energy-rich diets. In the present study, we have explored the possibility that glycation of LDL may occur in diabetes-prone *Psammomys obesus* gerbils and affect platelet and macrophage functions. The glycation of LDL, isolated from diabetic animals, was significantly ($p < 0.05$) higher (40%) than that of control animals. The incubation of platelets with glycated LDL enhanced the reactivity of platelets by 32-44% depending on the aggregating agents (Thrombin, collagen, ADP). Furthermore, LDL derived from diabetic rats were chemotactic for normal monocytes, and stimulated the incorporation of [14 C]-oleate into cellular cholesteryl esters. The enhancement of platelet aggregation and cholesterol esterification in monocytes may contribute toward the accelerated development of atherosclerotic cardiovascular disease in these diabetic *Psammomys obesus* animals. This study also illustrates the relevance of studying atherosclerosis in the *Psammomys obesus* animal model, as it shows an increased tendency to develop diet-induced diabetes, which is associated with cardiovascular disorders.

Keywords: NIDDM, Glycated LDL, platelet aggregation, monocyte chemotaxis

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is commonly associated with marked alterations in plasma lipoproteins (Timar et al., 2000; Ginsberg, 1991). The abnormalities of plasma lipids and lipoprotein concentrations and composition widely contribute to accelerated atherosclerosis (Timar et al., 2000; Ginsberg, 1991). Several studies emphasized the involvement of glycation (nonenzymatic glycosylation) in the rapid development of atherosclerosis (Lyons, 1992; Vlassara et al., 2002). Indeed, the nonenzymatic binding of glucose to reactive amino groups located on lysine side chains of apolipoprotein (apo) B increased its proper atherogenic potential. Since Schleichers' pioneering study (Schleicher et al., 1981), extensive work has been carried out toward the understanding of the pathophysiologic relevance of glycation and oxidation of low-density lipoproteins (LDL). Not only were glycated LDLs present in hyperlipidemic and normolipidemic diabetic patients (Lyons et al., 1986; Klein et al., 1995), but the glycation also diminished the high affinity of the classical receptor, which mediates uptake and degradation of LDL *in vitro* (Witztum et al., 1982). Additionally, glycation promoted internalization by an alternative receptor of monocyte-macrophages that gave rise to foam cells (Lyons et al., 1987), decreased the rate of clearance of LDL *in vivo* (Sasaki et al., 1982), and compromised the regulation of hydroxymethylglutaraldehyde-coenzyme A (HMG CoA) reductase and acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activities (Lopes-Virella et al., 1988). Furthermore, the presence of nonenzymatically-bound glucose on lipoproteins may increase the likelihood of oxidative damage. In this situation, the glycation of apo B may cause the molecule to become chemically unstable, rendering it open to attack by free radicals generated by the peroxidation of lipid components of LDL, or may undergo further direct chemical modifications by oxidation, acetylation or

methylation (Lyons, 1992). Finally, the production of auto-antibodies directed to glycated proteins occurred *in vivo* (Witztum et al., 1983). These antigen-antibody complexes were found in atherosclerotic lesions and detected in the serum of experimental diabetic rats (Witztum et al., 1983, 1984). Despite major advances in the understanding of the risk factors associated with atherosclerosis, the pathophysiological processes leading toward the development of vascular lesions in diabetes remain obscure. Given the difficulty of exploring the etiology and the time course of lesion development in humans, diabetic animal models may provide excellent opportunities to elucidate mechanisms that may probably be common to animals and men. Recently, we have shown that the *Psammomys obesus* gerbil developed hyperinsulinemia, hyperglycemia and obesity when transferred to laboratory diets (Kalderon et al., 1983; Adler et al., 1986; Zoltowska et al., 2001). In nature, this animal is a herbivorous rodent, subsisting on a low energy, rich electrolyte diet. The diabetic state that develops in captivity can be prevented by feeding the animals a low energy diet, such as the saltbush diet (Adler et al., 1986). Therefore, the *Psammomys obesus* model is particularly well suited to highlight the development of hyperinsulinemia, insulin resistance, obesity and diabetes in populations subjected to nutritional abundance and genetically predisposed to diabetes. However, studies are needed to demonstrate that this animal is able to display some of the features associated with the atherosclerotic complications of diabetes. This study was, therefore, designed to determine whether the glycation of LDL can occur in this diabetic *Psammomys obesus*, with potential consequences on platelet and macrophage functions.

MATERIALS AND METHODS

Animals: *Psammomys obesus* gerbils (age 2.5-3.5 months) from the Hebrew University (Jerusalem, Israel) were used for this study. After weaning, the animals were maintained on a low energy diet containing 2.38 kcal/g (Koffolk, Petach Tikva, Israel) until the beginning of the experiments. They were then switched to a high energy diet (2.93 kcal/g) for 2 weeks. Water and food were supplied ad libitum. Animals with normoinsulinemia, normoglycemia, hyperglycemia and hyperinsulinemia were used for the present studies. All experimental procedures performed herein were authorized by the Institutional Animal Care Committee.

Isolation of LDL: Blood was collected on EDTA after an overnight fast. Plasma LDL (1.063 g/ml) were isolated by sequential ultracentrifugation as described previously (Levy et al., 1990). Lipoprotein deficient serum (LPDS) was prepared as reported previously (Levy et al., 1990).

Glycation: LDL diluted to 1 mg/ml was measured as essentially described by Lyons et al (Lyons et al., 1986). Briefly, apoprotein of LDL was reduced by tritiated sodium borohydrate (360 mCi/mmol, New England Nuclear, Montreal, Canada) so that tritium was incorporated into the ketoamine group formed by the attachment of glucose to protein. After acid hydrolysis, the resultant tritiated glycated amino acids (³H-hexitol amino acids) were eluted through affinity chromatography, and radioactivity was counted. The amount of hydrolyzed apoprotein applied to chromatography was measured and expressed in micrograms. The extent of glycation was expressed as counts per minute per microgram of hydrolyzed protein.

Platelet Aggregation: Platelets were isolated from citrated blood obtained from normal animals. Platelets were washed, suspended in Tyrode's buffer, counted and adjusted to 4×10^8 /ml. Platelet aggregation was assessed as essentially described by Watanabe et al (Watanabe et al., 1988).

Chemotaxis Assay: Chemotaxis was measured in using freshly prepared monocytes as described (Quinn et al., 1987).

Monocyte Isolation and Measurement of Esterified Cholesterol Content:

Monocytes were prepared following Freundlich's procedure (Freundlich et al., 1983). Cholesteryl ester synthesis was determined after incubation of monocyte-derived macrophages with control or diabetic LDL (100 μ g protein/ml). After maturation of macrophages, the cells were extensively washed with PBS and incubated with serum-free medium containing 0.2 mM [14 C]-oleic acid complexed with 2.4 mg albumin. The cells were then incubated at 37°C for 20h. After the incubation, the medium was removed and the cells were washed with PBS before being harvested. Lipid extraction of the cells (pelleted by centrifugation) was performed with chloroform-methanol (2:1, v/v). Cholesteryl [14 C]-oleate was isolated by thin-layer chromatography and counted as previously described (Levy et al., 1992).

Biochemical Analyses: Plasma glucose, cholesterol and triglycerides were determined using Boehringer kits (Mannheim, FRG). Plasma insulin levels were quantitated by radioimmunoassay (Phadesph; Kabi Pharmacia Diagnostics, Sweden).

Statistical Analysis: Statistical analysis was performed with the mean paired Student's *t* test.

RESULTS

Plasma Parameters: As observed in Table 1, a proportion of the *Psammomys obesus* animals developed diabetes based on glucose and insulin determinations. Concomitantly, they exhibited abnormally high values of triglycerides and cholesterol compared to normal animals.

LDL Glycation: In order to determine whether glycation occurs in *Psammomys obesus*, LDL were isolated from both groups of animals and LDL glycation was measured. As shown in Table 2, the glycation of LDL isolated from diabetic *Psammomys obesus* was significantly higher (~ 40%) than that of LDL particles derived from controls. Changes were also noted in the chemical composition of LDL. Triglyceride, cholesteryl ester and protein enrichment as well as free cholesterol and phospholipid depletion characterized diabetic LDL particles.

Platelet Aggregation: The effect of glycated LDL on aggregation of normal platelets was also evaluated. The incubation of platelets with diabetic LDL markedly enhanced the reactivity of platelets with the different aggregating agents (Figure 1).

Chemotaxis and Macrophage Cholesterol Esterification: LDL derived from diabetic *Psammomys obesus* were found to be chemotactic for monocytes (Table 3). Furthermore, diabetic LDL stimulated the incorporation of [14 C] oleate into cellular cholesteryl esters of monocytes 4.8 fold relative to their plasma LPDS counterpart. On the other hand, only a 2.7 fold stimulation of [14 C]-oleate incorporation by control LDL was achieved using their plasma LPDS counterpart.

DISCUSSION

Psammomys obesus animals are prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia when fed a high energy diet (Kalderon et al., 1983; Adler et al., 1986; Zoltowska et al., 2001). However, the abnormalities of lipoprotein metabolism that are intimately related to the development of atherosclerosis, have not yet been investigated in this diabetic animal model. In the present study, we have explored the possibility that the nonenzymatic glycosylation of LDL, a process occurring in diabetes because of their increased ambient glucose levels, may potentiate certain processes which are relevant to cardiovascular disease. Our data demonstrated that glycated LDL, present in diabetic gerbils, enhanced platelet sensitivity to some aggregating agents. Furthermore, glycated LDL was chemotactic for monocytes, and produced much greater stimulation of cholesterol esterification.

Increased nonenzymatic glycosylation of proteins has been implicated in the etiology of several complications in diabetes mellitus, including cataract formation, connective tissue abnormalities and macrovascular disease (Lyons, 1992). This is the first study documenting the effect of the nonenzymatic glycosylation of atherogenic LDL particles in *Psammomys obesus* animals. In this context, it has been postulated that abnormal platelet function may be one of the factors contributing to the increased incidence of macrovascular disease in diabetic patients (Watanabe et al., 1988). The results presented in this paper show that one of possible mechanisms responsible for the enhancement of platelet aggregation is the glycation of LDL, confirming and extending the data presented previously by Watanabe et al (Watanabe et al., 1988).

The recognition of glycated LDL by the classic LDL receptor is markedly impaired (Witztum et al., 1982). These biologically modified LDL particles are preferentially recognized by both murine and human macrophages via a high-affinity receptor, the scavenger receptor. They may induce a massive intracellular accumulation of cholesteryl ester in these cells (Lopes-Virella et al., 1988). Although we have not measured the scavenger receptor activity in the current investigation, our data revealing cholesteryl ester accumulation, suggest that monocyte-derived macrophages recognized and degraded glycated LDL in *Psammomys obesus*. Lopes-Virella et al. Have demonstrated that human monocytes recognize glycated LDL to a greater extent than normal LDL (Lopes-Virella et al., 1988). This probably occurs through a pathway independent of the classic LDL-receptor pathway. As macrophages are thought to be the precursors of most of the lipid-laden foam cells characteristic of the early atheromatous lesion, we suggest that atherosclerosis may be a complication of diabetes characterizing *Psammomys obesus* animals.

In view of the chemical abnormalities of LDL isolated from diabetic animals, additional studies are needed to delineate whether glycation per se or the other perturbations seen in diabetic LDL are responsible for altered platelet and macrophage function. However, it should be noted that increased platelet aggregation was detected in diabetic patients even when their plasma lipid and lipoprotein levels were normal (Watanabe et al., 1988). Thus, the glycation process may play a role in the underlined platelet modifications.

In this study, we have examined the *in vivo* occurring nonenzymatic glycosylation only in LDL. In fact, increased glycation can affect other lipoprotein classes and

apoproteins. Curtiss and Witztum found elevated levels of glycation in VLDL and HDL apoproteins (Curtiss et al., 1983). Further work is necessary to explore the repercussions of these modified particles.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Dairy Farmers of Canada and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We thank Schohraya Spahis for skilfully typing the manuscript.

REFERENCES

1. Adler J.H., Lazarovici G., Marton M., Levy E., 1986. The diabetic response of weanling sand rats (*Psammomys obesus*) to diets containing different concentrations of salt bush (*Atriplex halimus*). *Diabetes Research* 3, 169-171.
2. Curtiss L.K., Witztum J.L., 1983. A novel method for generating region-specific monoclonal antibodies to modified proteins. Application to the identification of human glucosylated low density lipoproteins. *Journal of Clinical Investigation* 72, 1427-1438.
3. Freundlich B., Avdalovic N., 1983. Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes. *Journal of Immunological Methods* 62, 31-37.
4. Ginsberg H.N., 1991. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care* 14, 839-855.
5. Kalderon B., Adler J.H., Levy E., Gutman A., 1983. Lipogenesis in the sand rat (*Psammomys obesus*). *American Journal of Physiology* 244, E480-E486.
6. Klein R.L., Laimins M., Lopes-Virella M.F., 1995. Isolation, characterization, and metabolism of the glycated and nonglycated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects. *Diabetes* 44, 1093-1098.
7. Levy E., Thibault L., Garofalo C., Messier M., Lepage G., Ronco N., Roy C.C., 1990. Combined (n-3 and n-6) essential fatty deficiency is a potent modulator of

- plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes. *Journal of Lipid Research* 31, 2009-2017.
8. Levy E., Thibault L., Roy C.C., Letarte J., Lambert M., Seidman E.G., 1990. Mechanisms of hypercholesterolaemia in glycogen storage disease type I: defective metabolism of low density lipoprotein in cultured skin fibroblasts. *European Journal of Clinical Investigation* 20, 253-260.
 9. Levy E., Thibault L., Menard D., 1992. Intestinal lipids and lipoproteins in the human fetus: modulation by epidermal growth factor. *Journal of Lipid Research* 33, 1607-1617.
 10. Lopes-Virella M.F., Klein R.L., Lyons T.J., Stevenson H.C., Witztum J.L., 1988. Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Diabetes* 37, 550-557.
 11. Lyons T.J., Baynes J.W., Patrick J.S., Colwell J.A., Lopes-Virella M.F., 1986. Glycosylation of low density lipoprotein in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes: correlations with other parameters of glycaemic control. *Diabetologia* 29, 685-689.
 12. Lyons T.J., Klein R.L., Baynes J.W., Stevenson H.C., Lopes-Virella M.F., 1987. Stimulation of cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by low-density lipoproteins from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: the influence of non-enzymatic glycosylation of low- density lipoproteins. *Diabetologia* 30, 916-923.

13. Lyons T.J., 1992. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes* 41(2), 67-73.
14. Quinn M.T., Parthasarathy S., Fong L.G., Steinberg D., 1987. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 2995-2998.
15. Sasaki J., Cottam G.L., 1982. Glycosylation of LDL decreases its ability to interact with high- affinity receptors of human fibroblasts in vitro and decreases its clearance from rabbit plasma in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 713, 199-207.
16. Schleicher E., Deufel T., Wieland O.H., 1981. Non-enzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. Elevated epsilon-lysine glycosylated low density lipoprotein in diabetic patients. *FEBS Letters* 129, 1-4.
17. Timar-Banu O., Beauregard H., Tousignant J., Lassonde M., Harris P., Viau G., Vachon L., Levy E., Abribat T., 2001. Development of noninvasive and quantitative methodologies for the assessment of chronic ulcers and scars in humans. *Wound repair and regeneration* 9, 123-132.
18. Vlassara H., Palace M.R., 2002. Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of internal medicine* 251, 87-101.

19. Watanabe J., Wohltmann H.J., Klein R.L., Colwell J.A., Lopes-Virella M.F., 1988. Enhancement of platelet aggregation by low-density lipoproteins from IDDM patients. *Diabetes* 37, 1652-1657.
20. Witztum J.L., Mahoney E.M., Branks M.J., Fisher M., Elam R., Steinberg D., 1982. Nonenzymatic glucosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* 31, 283-291.
21. Witztum J.L., Steinbrecher U.P., Fisher M., Kesaniemi Y.A., 1983. Nonenzymatic glucosylation of homologous low density lipoprotein and albumin renders them immunogenic in the guinea pig. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 2757-2761.
22. Witztum J.L., Steinbrecher U.P., Kesaniemi Y.A., Fisher M., 1984. Autoantibodies to glucosylated proteins in the plasma of patients with diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 3204-3208.
23. Zoltowska M., Ziv E., Delvin E., Stan S., Bar-On H., Kalman R., Levy E., 2001. Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in *Psammomys obesus* prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Atherosclerosis* 157, 85-96.

FIGURE LEGEND

Figure 1: Aggregation of platelets incubated with control and glycated LDL. Values are expressed as percentages of aggregation rate of platelets incubated with LDL from normal animals. Differences with all the aggregating agents were significant ($p < 0.01$). Values are means \pm SEM, $n=4$ / group.

Table 1**Body weight and biochemical plasma parameters of control and diabetic animals**

Animals	Body weight (g)	Glucose (mg/dL)	Insulin (μU/ml)	Triglyceride (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)
Control (n=20)	89.2 \pm 3.1	82.0 \pm 3.6	68.4 \pm 12.7	58.6 \pm 8.9	66.0 \pm 7.2
Diabetic (n=20)	119.0 \pm 4.2	366.1 \pm 19.6*	205.8 \pm 25.3*	299.5 \pm 13.4*	149.4 \pm 11.4*

Values are means \pm SEM

* p < 0.01

Table 2**Glycation and lipid composition of LDL from diabetic and control animals**

Animals	Glycation* (dpm/mg)	TG	CE	FC	PL	PR
%						
Control (n=4)	51.300±2.300	7.0±1.5	26.2±1.9	12.2±0.1	40.1±5.6	14.6±2.4
Diabetic (n=4)	72.200±3.100 [†]	11.7±3.1 [†]	36.5±2.6 [†]	2.5±0.2 [†]	21.8±3.3 [†]	27.3±2.6 [†]

Values are means ± SEM.

* Measures of [3H] hexitol amino acid.

[†] p < 0.05

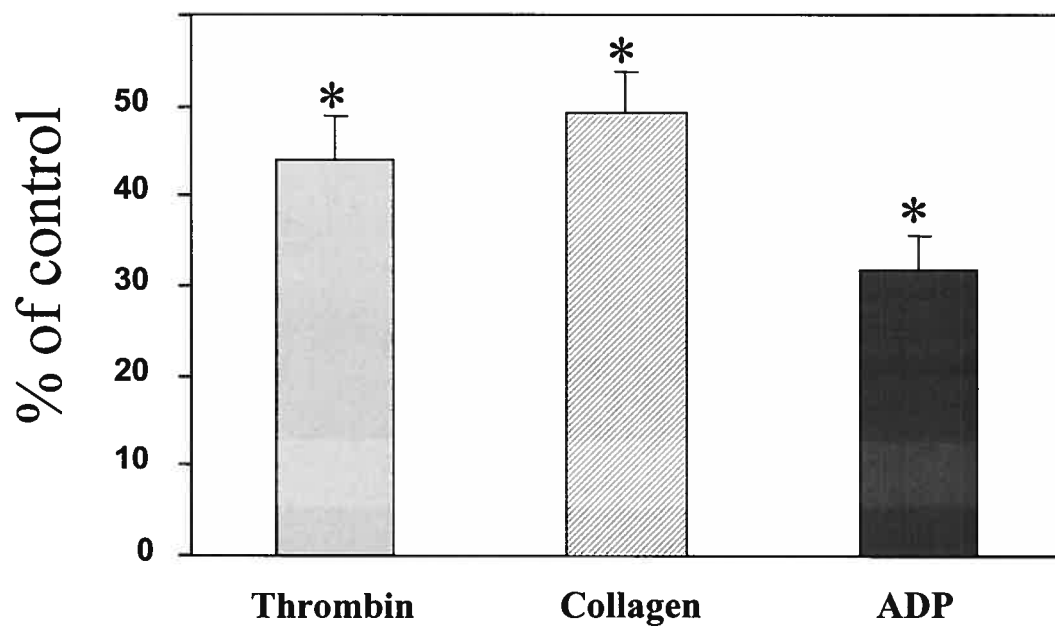
Table 3

Effect of LDL on chemotaxis and cholesterol esterification in *Psammomys obesus* peritoneal macrophages

LDL Source	Chemotactic index *	Cholesterol esterification ($\mu\text{mol/mg cell protein/15h}$)
Diabetic	5.3	18.8 \pm 3.7 [†]
Control	1.6	2.7 \pm 0.3

* Number of cells migrating in response to the test substance divided by the number of cells migrating when control medium is present in each chamber. Values for chemotactic index were carried in duplicata, whereas those of cholesterol esterification are mean \pm SEM for n=4.

† p < 0.05

Figure 1

* $p < 0.01$

6. Article 5

**Article accepté pour publication à Canadian Journal of Physiology and
Pharmacology, 2003**

Vascular responses to α -adrenergic stimulation and depolarization are enhanced in insulin resistant and diabetic *Psammomys obesus*

M. Zoltowska¹, J. St-Louis³, E. Ziv⁴, B. Sicotte³, E.E. Delvin², E. Levy¹

Research Centre, Hôpital Sainte-Justine, and Departments of ¹Nutrition, ²Biochemistry and ³Obstetrics-Gynecology and Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

H3T 1C5. ⁴Diabetes Unit, Division of Internal Medicine, Hadassah University Hospital, Jerusalem, Israel 91120

Address correspondence to:

Dr. Emile Levy

Gastroenterology and Nutrition Unit

Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine Road

Montreal, Quebec H3T 1C5

Tel.: (514) 345-4626

Fax: (514) 345-4999

E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

Since vascular complications often accompany diabetes, we examined the influence of endothelial lining on vascular reactivity in *Psammomys obesus*, a desert gerbil that acquires, insulin resistance and diabetes when exposed to a laboratory diet. Vasoconstriction to phenylephrine and depolarizing KCl, as well as carbachol endothelium-dependent relaxation were assessed in rings of thoracic aortae obtained from (A) normoglycemic/normoinsulinemic, (B) normoglycemic/hyperinsulinemic and (C) hyperglycemic/hyperinsulinemic animals. As expected, marked hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia characterized Groups B and C, which developed enhanced contractile responsiveness to phenylephrine and KCl, compared with controls (Group A). Furthermore, both experimental groups displayed a significant decrease in endothelium-dependent relaxation to carbachol. Altered lipid profiles are considered of playing some role in the observed modification of aortic reactivity. Overall, our data indicate that vascular contractile response is enhanced early in the development of insulin-resistance and diabetes in the female *Psammomys obesus*.

Keywords: Insulin resistance, diabetes, vascular reactivity, LDL-cholesterol, hypertriglyceridemia.

1. INTRODUCTION

The vascular endothelium, a target for and a mediator of vasoactive agents, plays a major role in regulating blood flow and mononuclear cell migration, and in maintaining vascular architecture, (Bevilacqua *et al.*, 1993, Zeiher *et al.* 1994). Pinkney *et al.* (1997) have shown that endothelial dysfunction was associated with insulin resistance (IR) in subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). They proposed that the insulin resistance syndrome (IRS) and many of the aspects of atherogenesis could be perceived as the multiple consequences of endothelial dysfunction in different vascular beds. Diverse observations militate in favour of this proposal.

Closely related to the present subject, Cleland *et al.* (1998), in a review, have proposed that insulin could act as a vascular hormone. This concept fits the collective data that show that 1) systemic hyperinsulinemia increases limb blood flow (Utrianen *et al.*, 1996); 2) insulin stimulates endothelial nitric oxide production (Petrie *et al.*, 1996); 3) insulin acts on vascular smooth muscles through the stimulation of the Na^+/H^+ exchanger and Na^+/K^+ ATPase (Tack *et al.*, 1996). In addition to the preceding reports, Zemel *et al.* (1992) have established, using denuded rat aortic strips, that insulin had a direct effect on vascular relaxation through the Ca^{++} -ATPase. In line with these observations, Zierler and his group (Zierler, 1987, Wu and Zierler, 1989) have shown, in myotubes isolated from foetal rat hind limbs, that insulin increased the membrane electrical potential difference and decreased both an early, fast and transient Ca^{2+} current and a slow inward current. Thus loss of insulin sensitivity leading to impaired membrane electrophysiological characteristics could explain, in part, the hypertension, the

microangiopathy, the macroangiopathy and the atherosclerotic lesions associated with IRS and NIDDM (Garcia *et al.* 1974, Jarrett, 1989).

Different animal models have been used to study the role of the endothelium in diabetes. Taylor *et al.* (1994), observed an increased vascular sensitivity to noradrenaline and an impaired acetylcholine-induced relaxation in the mesenteric arterial tree of the streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat (model for Type 1 diabetes). Similarly, Utkan *et al.* (1998) reported that in STZ-induced diabetic rat, the contractile responsiveness of the thoracic aortic muscles and the endothelial functions were significantly altered when challenged with endothelin-1 or nitric oxide. Few studies have been reported with spontaneously diabetic animal models. Meraji *et al.* (1987) have determined that aorta endothelium-dependent relaxation, after pre-contraction with norepinephrine, was impaired in the diabetic BB Wistar rat. Five years later, Zemel *et al.* (1992) verified that the hypertension observed in insulin-resistant obese Zucker rats was independent of sympathetic neural activity and was a reflection of exaggerated vascular reactivity. Using isolated aorta from the same animal model, Turner *et al.* (1995) showed that insulin attenuated the contractile response to phenylephrine but markedly enhanced the vasoconstrictor potency of 5-hydroxytryptamine, thereby establishing that increased reactivity of conduit arteries to vasopressor agents was probably involved in the development of hypertension in the hyperinsulinemic Zucker rat. Finally, O'Brien *et al.* (1998), using the JCR:LA-cp rat, a model exemplifying predisposition to and increased risks for cardiovascular disease with profound insulin-resistance, demonstrated that aorta and mesenteric arteries from obese animals exhibited enhanced maximal response to phenylephrine compared to those from the lean animals. They also observed

that, whereas aortic rings had a normal relaxation profile with acetylcholine, that of the mesenteric arteries was impaired. They concluded from these observations that functional modifications in the obese insulin-resistant state are more pronounced in the mesenteric resistance arteries than in major conductance arteries.

The gerbil or sand rat *Psammomys obesus*, a model for Type 2 diabetes or non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), lapses into hyperinsulinemia and hyperglycemia when transferred from its habitual desert food to standard laboratory rodent diets (Adler *et al.*, 1986; Schmidt-Nielsen *et al.*, 1964; Ziv and Shafrir, 1995). The genetically predisposed sand rats disclose a wide range of disease severity (Kalderon *et al.*, 1983; Kalderon *et al.*, 1986). They fall into three groups, according to plasma glucose and insulin levels. With reference to normoglycemic and normoinsulinemic *Psammomys obesus* (Group A), a high proportion of animals display hyperinsulinemia (Group B), which appears to compensate for both peripheral and hepatic insulin resistance as evidenced from the persistence of normoglycemia. In Group C, glycemia is no longer compensated for, in spite of the extraordinary increase in plasma insulin levels. Thus, the *Psammomys obesus* rat represents a powerful tool to follow the metabolic changes that occur during the development of insulin resistance and diabetes under nutritional abundance. This model is preferable to the streptozotocin diabetic rat, which is useful in understanding metabolic derangement of Type 1 diabetes, but are less effective in representing Type 2 diabetes. In this study, the modifications of vascular reactivity were assessed during the development of diabetes in *Psammomys obesus*.

2. METHODS

2.1. Animals and Diet

Female sand rats from the Hebrew University (Hadassah Medical School Animal Farm) strain were used. After weaning, at 3 weeks of age, the animals were maintained on diets (Hedera, Israel) of varying digestible caloric densities [high energy chow: 2.93 kcal/g, or low energy (Atriplex halimus): 2.38 kcal/g]. Over a two week period all animals consumed similar quantities, irrespective of the diet consumed. In a 14-18 week window, they were classified into three groups differing in extent of the diabetic syndrome: [normoglycemic-normoinsulinemic, Control group (A); normoglycemic-hyperinsulinemic, Insulin-resistant group (B) and hyperglycemic-hyperinsulinemic, Diabetic group (C)] according to biochemical characterisation of the blood samples. They were then sacrificed. Details of the food composition, breeding and maintenance have been previously reported (Kalman *et al.*, 1993). Food and water were provided *ad libitum*. The *Psammomys obesus* rats were housed in a temperature-controlled room with a 12:12 h light-darkness cycle. The Institutional Animal Care Committee authorized experimental procedures.

2.2. Organ Bath Assay

After sacrifice, the thoracic aorta was rapidly removed, cleansed of fat and extraneous tissues and placed in ice-cold Krebs bicarbonate solution (KBS). Four consecutive rings (2-3 mm) were placed in 15 ml individual jacketed organ baths (Radnoti Glass, Monrovia, CA) maintained at 37°C and equilibrated for 60 min under 2.0 g passive tension (the optimal tension for all groups of tissues determined in

preliminary experiments), with frequent washings and tension adjustments. The tissues were bathed in KBS (pH 7.4) with the following composition (all mM): 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, 1.18 MgSO₄, 1.18 KH₂PO₄, and 5.5 dextrose. The solution was bubbled with a mixture of 95% O₂-5% CO₂. After equilibration, the tissues were challenged with 1.0 μ M phenylephrine. At plateau response, carbachol (0.1 mM) was added to evaluate endothelial function. Tension was measured by force-displacement transducers (FT-03, Grass Instruments, Quincy, MA) and recorded on a Grass polygraph (Model 7E).

2.3. Experimental Protocol

The cumulative concentration-response curves were performed with phenylephrine (1nM to 100 μ M) and KCl (2 to 100 mM). The order of agonist addition alternated in each experiment. A 90 min period of equilibration was allowed between the measurements of the two concentration-response curves. In some experiments, the first contractility concentration-response curve to phenylephrine was followed by a vasorelaxation response curve to carbachol. This was achieved by precontracting the aortic rings with 1 μ M phenylephrine and, at plateau response (\pm 10 min), measuring a cumulative concentration-response curve to carbachol (10nM to 100 μ M).

2.4. Other Analyses

Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method with a hand-held glucose analyzer. Insulin was determined by microparticle immunoenzyme assay

(Abbott Laboratories, Montreal, Canada). Total plasma cholesterol and triglyceride were determined using enzymatic techniques (Boehringer Mannheim, Germany).

2.5. Data Analysis

Biochemical data were analysed by multivariate ANOVA and the Student's two-tailed *t*-test for unpaired variates. Each concentration-response curve was analysed by computer fitting to a four-parameter sigmoid curve using the Prism 3.0 Program (GraphPad, San Diego, CA) to evaluate the EC_{50} and the maximum asymptote of the curve (E_{max}). Different curves in the same protocol were compared by the two-way ANOVA, using pD_2 ($-\log EC_{50}$ to compare sensitivity of each agonist between the 3 groups of animals). Data are expressed as mean experimental points with their SEM along the best curve fitted to these points. All values represent mean \pm SEM.

3. RESULTS

As shown in Table 1, the animals developed hyperinsulinemia associated with a moderate weight gain (Insulin resistant group). However, in the diabetic group, the significantly high insulin levels failed to contain the progression of hyperglycemia that accompanied obesity. Investigation of lipid patterns revealed substantial changes in plasma triglycerides and cholesterol concentrations (Table 2). Insulin-resistant and diabetic groups elicited significant hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia consistent with the elevated lipoprotein levels.

Concentration response curves to phenylephrine are shown in Fig. 1A. Maximum response increased from 1.39 ± 0.05 g (Control group) to 2.12 ± 0.07 in the insulin-resistant group (Insulin-resistant group) without further change (1.87 ± 0.06 g) for the hyperinsulinemic-hyperglycemic group (Diabetic group). The increased responsiveness in insulin-resistant and diabetic gerbils was matched with significant augmentation in sensitivity to the α -adrenergic agonist, pD_2 increasing from 6.84 ± 0.07 in Group A to 7.04 ± 0.07 in Groups B and C ($p < 0.05$). As shown in Fig 1B, when KCl was used as a depolarizing agent, an upward shift in the maximum KCl concentration-response curve was observed in Groups B and C (2.43 ± 0.08 and 2.30 ± 0.17 g, respectively) vs Group A (1.89 ± 0.09 g). Sensitivity to KCl ($-\log EC_{50}$ or pD_2) was similar for the aortic rings of the 3 groups of animals, varying from 1.77 ± 0.03 to 1.91 ± 0.07 .

Fig 1C illustrates the endothelium-dependent relaxation in response to increasing carbachol concentrations. Compared to normal gerbils (group A), groups B and C exhibited significant decrease in maximal relaxation to carbachol (76.9 ± 2.3 % vs 54.1

± 2.8 and 63.0 ± 2.4 %, respectively, $P < 0.001$). This was accompanied with a significant reduction in sensitivity to the agonist [pD_2 from 6.56 ± 0.07 (Group A) to 5.95 ± 0.10 (Group B) and 6.26 ± 0.08 (Group C), $p < 0.05$].

4. Discussion

The sequential biochemical transition to insulin resistance and diabetes could be followed through changes in the sand rat's usual lifestyle. The increase in circulating insulin concentration probably occurred to preserve normoglycemia; this represents the hallmark of insulin resistance (Adler *et al.*, 1986; Kalderon *et al.*, 1983; Kalderon *et al.*, 1986; Kalman *et al.*, 1993; Shafrir and Ziv, 1998; Ziv and Shafrir, 1995). In the desert, caloric intake is low and physical expenditure high. In the laboratory, the inactive animals became diabetic when placed on the relatively high caloric diet (Shafrir and Ziv, 1998). The development of nutrition-induced insulin resistance and diabetes in this animal model mimics that of human populations emerging from a food-scarce environment into nutritional affluence inappropriate for human metabolic capacity (O'Dea *et al.*, 1988; Swinburn *et al.*, 1991).

The *in vitro* vascular reactivity data from the present study demonstrate, for the first time, increased responsiveness to vasoconstrictors and sensitivity to phenylephrine and a reduced endothelium-dependent relaxation to carbachol in insulin-resistant (normoglycemic-hyperinsulinemic) *Psammomys obesus* sand rats. These modifications were not exacerbated in diabetic (hyperglycemic-hyperinsulinemic) animals. Thus these observations indicate that the insulin-resistant state is the major factor leading to alteration of vascular response to agonists. Our results somewhat differ from the lack of

changes in sensitivity to norepinephrine (α -adrenergic agonist) in aortic rings of streptozotocin-induced diabetic female rats reported by Taylor *et al.* (1994). This variance could be explained on the basis of the model used. Indeed the streptozotocin-induced diabetic rat is a representation of Type 1 diabetes whereas *Psammomys obesus* is a reflection of Type 2 diabetes. However it should be noted that the aortic rings of BB rats, a genetic model for Type 1 diabetes (Greiner *et al.* 2001), present enhanced sensitivity to α -adrenergic agonists as well as a decrease in aorta endothelium-dependent relaxation to A-23187 (Durante *et al.*, 1988). Similarly, Turner *et al.* (1995) have reported that the reactivity of isolated aorta of obese Zucker rats to phenylephrine and 5-hydroxytryptamine was increased two-fold when compared to lean animals. At the opposite, Auguet *et al.* (1989) have reported that intact aortic rings (with endothelium) from obese Zucker rats exhibited reduced contractility when challenged with phenylephrine and enhanced endothelium-dependent relaxation induced by carbachol.

The increased vessel contractility was observed both for receptor-dependent agonist (phenylephrine) and receptor-independent stimuli (KCl depolarization), indicating that, in *Psammomys obesus*, the insulin resistant condition perturbs some intracellular coupling mechanisms that are common to α agonist- and K^+ -evoked contractions. The present data suggest that endothelial function could be a significant effector. Indeed, responses to phenylephrine were greater in the insulin-resistant than in the diabetic group, as was carbachol-induced relaxation more markedly depressed in these animals. It is well known that adrenergic responsiveness increases proportionally to the relative reduction of endothelial function (Auguet *et al.*, 1989; Parent *et al.*, 1990). The increased responsiveness to phenylephrine and KCl reported here in the aorta of

both insulin-resistant and diabetic sand rats is compatible with the observed differential reduction of vaso-relaxant endothelial function (St-Louis and Sicotte, 1992). As mentioned above, a similar reduction of endothelial-dependant relaxation has already been observed in the aorta of diabetic BB rats (Durante *et al.*, 1988), but not in streptozotocin-treated animals (Taylor *et al.*, 1994). Therefore, these findings highlight functional differences between Type 1 and 2 diabetic models in terms of vascular consequences.

These considerations do not exclude the involvement of other important factors, including intracellular coupling mechanisms, lipid metabolism or others (Sowers, 1997). The status of lipids and lipoproteins in insulin resistance and diabetes could affect the vascular reactivity of the endothelium. For example, there was a positive correlation between the maximum asymptote of the phenylephrine concentration-response curves (Emax) on the one hand, and body weight, total cholesterol, triglycerides and LDL cholesterol on the other (Fig 2A-D), all inter-related events to the development of Type 2 diabetes. Likewise, some relationship was found between maximal responses to KCl and total cholesterol. This suggests that cholesterol could be involved in the impairment of endothelium-dependent relaxation in this natural model of Type 2 diabetes.

A peculiar feature of the present set of experiments resides in the use of female animals, as did the group of Taylor and co-workers (Taylor *et al.*, 1994). The fact that modifications of aortic reactivity was observed despite a potential cytoprotective role of estrogens on cardiovascular system is of importance as it suggest that endothelial damage might be even more severe in male animals. In this respect, Ghanam *et al.* (2000) have shown that chronic treatment of cholesterol-fed rabbit with 17β -estradiol

restored the impaired relaxation to acetylcholine and suggested that the cytoprotective effect was mediated through an endothelial nitric oxide release. A gender-specific difference in vascular responses to insulin has been reported by Peuler *et al.* (1993) in stroke-prone hypertensive rats. Also, studies in primates have shown that estrogen therapy has a protective effect against atherosclerosis-linked endothelial damage that cannot be explained by the beneficial effects of the steroid on lipid metabolism alone (Barrett-Connors and Bush, 1991). Interestingly, it has been reported that basal release of the potent endothelium-derived vasorelaxant, nitric oxide (NO), from aortic rings is enhanced in female compared to male rats (Kauser and Rubanyi, 1994). How this observation may be tied to the gender-dependent protection against cardiovascular diseases remains to be elucidated. Clearly, studies similar to the one reported here have to be performed in male *Psammomys obesus* to measure the impacts of gender on vascular reactivity of these animals.

The data presented here indicate that aortic vascular contractile response is enhanced early in the development of insulin-resistance and diabetes in *Psammomys obesus*, a particularly fitted model of nutrition and living habit-derived diabetes in human. The enhanced reactivity to vasoconstrictors appears to be linked to altered endothelium-dependent relaxation. More, investigations are needed to document the relationship between the modified vascular responsiveness and lipid metabolism.

REFERENCES

- Adler, H.J., Lazarovici, G., Marton, M., Levy, E., 1986. The diabetic response of weanling sand rats (*Psammomys obesus*) to diets containing different concentrations of salt bush (*Atriplex halimus*). *Diabetes Res.* 3, 169-171.
- Auguet, M., Delaflotte, S., Braquet, P., 1989. Increased influence of endothelium in obese Zucker rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* 41, 861-864.
- Barrett-Connor, E., Bush, T.L., 1991. Estrogen and coronary heart disease. *JAMA*, 265, 1861-1867.
- Bevilacqua, M.P., 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann. Rev. Immunol.* 11, 767-804.
- Blum, A., Cannon, R.O. 3rd., 1998. Effects of oestrogens and selective oestrogen receptor modulators on serum lipoproteins and vascular function. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 575-586.
- Cleland, S.J., Petrie, J.R., Ueda, S., Elliott, H.L., Connel, J.M., 1998. Insulin as a vascular hormone: implications for the pathophysiology of cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25, 175-184.
- Durante, W., A. H. Sen, F. A. Sunahara., 1988. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 94, 463-468.

- Garcia, M.J., McNamara, P.M., Gordon, T., Kannel, W.B., 1974. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 23, 105-111.
- Ghanam, K., Ea-Kim, L., Javellaud, J., Oudart, N., 2000. Involvement of potassium channels in the protective effect of 17beta-estradiol on hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *Atherosclerosis* 152, 59-67.
- Greiner, D.L., Rossini, A.A., Mordes, J.P., 2001. Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: caveat emptor and primum non nocere. *Clin Immunol* 100: 134-143..
- Herrington, D., 2000. Role of estrogens, selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens in cardiovascular protection. *Can. J. Cardiol.* 16 (Suppl. E), 5E-9E.
- Jarrett, R.J., 1989. Cardiovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 5, 547-558.
- Kahn, A. M., Husid, A., Odebunmi, T., Allen, J. C., Seidel, C. L., Song, T., 1998. Insulin inhibits vascular smooth muscle contraction at a site distal to intracellular Ca^{2+} concentration. *Am. J. Physiol.* 274, E885-E892.
- Kalderon, B., Adler, H.J., Levy, E., Gutman, A., 1983. Lipogenesis in the sand rat (*Psammomys obesus*). *Am. J. Physiol.* 244, E480-E486.

- Kalderon, B., Gutman, A., Levy, E., Shafir, E., Adler, J.H., 1986. Characterization of stages in development of obesity-diabetes syndrome in sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetes* 35, 717-724.
- Kalman, R., Adler, J.H., Lazarovici, G., Bar-On, H., Ziv, E., 1993. The efficiency of sand rat metabolism is responsible for development of obesity and diabetes. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 4, 57-68.
- Kamata, K., Miyata, N., Abiru, T., Kasaya, T., 1992. Functional changes in vascular smooth muscle and endothelium of arteries during diabetes mellitus. *Life Sci.* 50, 1379-1387.
- Kauser, K., Rbanyi, G.M., 1994. Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated aortae. *Am. J. Physiol.* 267, H2311-H2317.
- Mather, K.J., Norman, E.G., Prior, J.C., Elliott, T.G., 2000. Preserved forearm endothelial responses with acute exposure to progesterone: A randomized cross-over trial of 17-beta estradiol, progesterone, and 17-beta estradiol with progesterone in healthy menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4644-4649.
- Meraji, S., Jayakody, L., Senaratne, M.P.J., Thomson, A.B.R., Kappagoda, T., 1987. Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat. *Diabetes* 36, 978-981.
- O'Brien, S.F., McKendrick, J.D., Radomski, M.W., Davidge, S.T., Russell, J.C., 1998. Vascular wall reactivity in conductance and resistance arteries: differential effects of insulin resistance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 72-76.

- O'Dea, K., Traianedes, K., Hopper, J.L., Larkins, R.G., 1988. Impaired glucose tolerance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in Australian aborigines from the desert. *Diabetes Care* 11, 23-29.
- Parent, A., Schiffrin, E.L., St-Louis, J., 1990. Role of the endothelium in adrenergic responses of mesenteric artery rings of pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163, 229-234.
- Petrie, J.R., Ueda, S., Webb, D.J., Elliott, H.L., Connell, J.M. 1996. Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity: A physiological link with implications for the pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation* 93: 1331-1333.
- Peuler, J.D., Johnson, B.A.B., Phare, S.M., Sowers, J.R., 1993. Sex-specific effects of an insulin secretagogue in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 22,214-220.
- Schmidt-Nielsen, K., Haines, H.B., Hackel, D.B., 1964. Diabetes mellitus in the sand rat induced by standard laboratory diets. *Science* 164, 489-490.
- Schnaper, H.W., McGuire, J., Runyan, C., Hubchak, S.C., 2000. Sex steroids and the endothelium. *Curr. Med. Chem.* 7, 519-531.
- Shafrir, E., Ziv, E., 1998. Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance: the desert rodent *Psammomys obesus* and other animals in which insulin resistance leads to detrimental outcome. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 9, 347-385.
- SI, M.L., Al-Sharafi, B., Lai, C.C., Khardori, R., Chang, C., Su, C.Y., 2001. Gender difference in cytoprotection induced by estrogen on female and male bovine aortic endothelial cells. *Endocrine* 15: 255-262.

- Sowers, J.R., 1997. Insulin and insulin-like growth factor in normal and pathological cardiovascular pathology. *Hypertension* 29,691-399.
- St-Louis, J. Sicotte, B., 1992. Prostaglandin- or endothelium-mediated vasodilation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166, 684-692.
- Swinburn, B.A., Boyce, V.L., Bergman, R.N., Howard, B.V., Bogardus, C., 1991. Deterioration in carbohydrate metabolism and lipoprotein changes induced by modern, high fat diet in Pima Indians and Caucasians. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73, 156-165.
- Tack, C.J., Lutterman, J.A., Vervoot, G., Thien, T., Smits, P. 1996. Activation of the sodium-potassium pump contributes to insulin-induced vasodilation in humans. *Hypertension* 28: 426-432.
- Taylor, P.D., Wickenden, A.D., Mirrlees, D.J., Poston, L., 1994. Endothelial function in the isolated perfused mesentery and aortae of rats with streptozotocin-induced diabetes: effect of treatment with the aldose reductase inhibitor, ponalrestat. *Br. J. Pharmacol.* 111, 42-48.
- Trovati, M., Anfossi, G., 1998. Insulin, insulin resistance and platelet function: similarities with insulin effects on cultured vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* 41, 609-622.
- Turner, N.C., Gudgeon, C., Toseland, N., 1995. Effects of genetic hyperinsulinaemia on vascular reactivity, blood pressure, and renal structure in the Zucker rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26, 714-720.

- Utkan, T., Sarioglu, Y., Yildirim, S., 1998. Impaired contraction and relaxation in the aorta of streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacology* 56, 207-215.
- Utrianen, T., Makimattila, S., Virkamaki, A., Bergholm, R., Yki-Jarvinen, H., 1996. Dissociation between insulin sensitivity of glucose uptake and endothelial function in normal subjects. *Diabetologia* 39: 1477- 1482.
- Wu, F.S., Zierler, K., 1989. Calcium currents in rat myoballs and their inhibition by insulin. *Endocrinology* 125: 2563-2572.
- Zeihner, A.M, Schachinger, V., Saurbier ,B., Just, H., 1994 Assessment of endothelial modulation of coronary vasomotor tone: insights into a fundamental functional disturbance in vascular biology of atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 89: 115-128.
- Zemel, M.B., Johnson, B.A., Ambrozy, S.A., 1992. Insulin-stimulated vascular relaxation. Role of Ca^{2+} -ATPase. *Am. J. Hypertens.* 5, 637-641.
- Zemel, M.B., Peuler, J.D., Sowers, J.R., Simpson, L., 1992. Hypertension in insulin-resistant Zucker obese rats is independent of sympathetic neural support. *Am J Physiol* 262, E368-E371.
- Zemel, M.B., Reddy, S., Sowers, J.R., 1991. Insulin attenuation of vasoconstrictor responses to phenylephrine in Zucker lean and obese rats. *Am. J. Hypertens.* 4, 537-539.
- Zierler, K., 1987. Insulin hyperpolarizes rat myotube without stimulating glucose uptake. *Diabetes* 36: 1035-1040.

Ziv, E., Shafrir, E., 1995. *Psammomys obesus*: nutritionally induced NIDDM-like syndrome on a “thrifty gene” background. *Lessons from Animal Diabetes*, London: Smith-Gordon, 5, 285-300.

LEGENDS

Figure 1: Concentration-response curves to Phenylephrine (A), KCl (B) and Carbachol (C) in aorta rings from *Psammomys obesus*: Control group (●), Insulin resistant group (■) and Diabetic group (▲). The contractile responses to phenylephrine (10^{-9} - 10^{-4} mol/L), and KCl (2-100 mmol/L) were expressed as tension in grams. For the relaxation experiments (Figure 1 C), aorta rings of the 3 groups of gerbils were pre-contracted with 1 μ M phenylephrine, raising the tone of aortic segments to 2.18 ± 0.21 , 2.27 ± 0.19 and 2.74 ± 0.28 g for the Control, Diabetic and Insulin-resistant groups respectively. These values were assigned the 0% relaxation value. Aorta rings were then exposed to Carbachol (10^{-8} – to – 10^{-4} mol/L). Results are expressed as % maximum tone.

Figure 2: Regression analysis between aortic ring maximal tonus (Emax) and body weight (panel A), total cholesterol (T-Chol) (panel B), LDL-cholesterol (LDL-Chol) (panel C) and triglycerides (panel D). Control group (●), Insulin resistant group (■) and Diabetic group (▲).

Figure 3: Panel A: Regression analysis between aortic ring maximal tonus when exposed to KCl (Emax) and total cholesterol (T-Chol). Panels B and C: Regression analysis between aortic ring contractility response pD₂ (-log

EC₅₀) and total cholesterol (T-Chol), glucose and insulin in Control (●),

Insulin resistant (■) and Diabetic (▲) groups.

Table 1: Characteristics of control, insulin resistant and diabetic *Psammomys* obesus

Variable	Control	Insulin-resistant	Diabetic
Glucose (mmol/L)	3.84 ± 0.20	3.85 ± 0.40	$15.98 \pm 1.50^{a,b}$
Insulin (pmol/L)	48 ± 6	782 ± 269^c	$3020 \pm 535^{a,d}$
Body wt (g)	167.7 ± 11.6	204.2 ± 5.7^c	$229.9 \pm 7.7^{a,e}$
Adipose tissue (g)	2.8 ± 0.3	5.9 ± 0.5^c	$8.6 \pm 0.5^{a,d}$

Values are means \pm SEM. Control group (n = 13), Insulin-resistant group (n = 8), Diabetic group (n = 8). The adipose tissue weight given is the total weight of excisable peri-renal adipose tissue.

The significance of the difference between groups for each variable was assessed by ANOVA and the Student t-test for unpaired variates.

Diabetic group vs Control^a and Insulin resistant^b group ($p < 0.001$); Insulin resistant group vs Control^c group ($p < 0.005$); Diabetic group vs Insulin resistant group^d ($p < 0.002$); Diabetic vs Insulin-resistant group^e ($p < 0.01$).

Table 2: Plasma lipid concentrations

Variable	Control	Insulin-resistant	Diabetic
TG (mmol/L)	0.74 ± 0.06	1.16 ± 0.22 ^a	1.93 ± 0.11 ^{b,c}
T-chol (mmol/L)	1.83 ± 0.13	2.87 ± 0.21 ^b	3.22 ± 0.20 ^b
LDL-C (mmol/L)	0.72 ± 0.09	1.41 ± 0.18 ^d	1.11 ± 0.12 ^e
HDL-C (mmol/L)	0.71 ± 0.05	0.97 ± 0.17	1.23 ± 0.08 ^b

Values are means ± SEM. Control group (n = 13), Insulin-resistant group (n = 8), Diabetic group (n = 8). The significance of the difference between groups for each variable was assessed by ANOVA and the Student t-test for unpaired variates. Insulin-resistant group vs Control^a: (p<0.03); Diabetic group and Insulin resistant groups vs Control^b: (p<0.001) Diabetic group vs Insulin-resistant group^c (p<0.01); Insulin-resistant group vs Control^d (p<0.002); Diabetic group vs Control^e (p<0.02). TG: Triglycerides; T-chol: Total cholesterol; LDL-C: Low Density Lipoprotein associated cholesterol; HDL-C: High Density Lipoprotein associated cholesterol

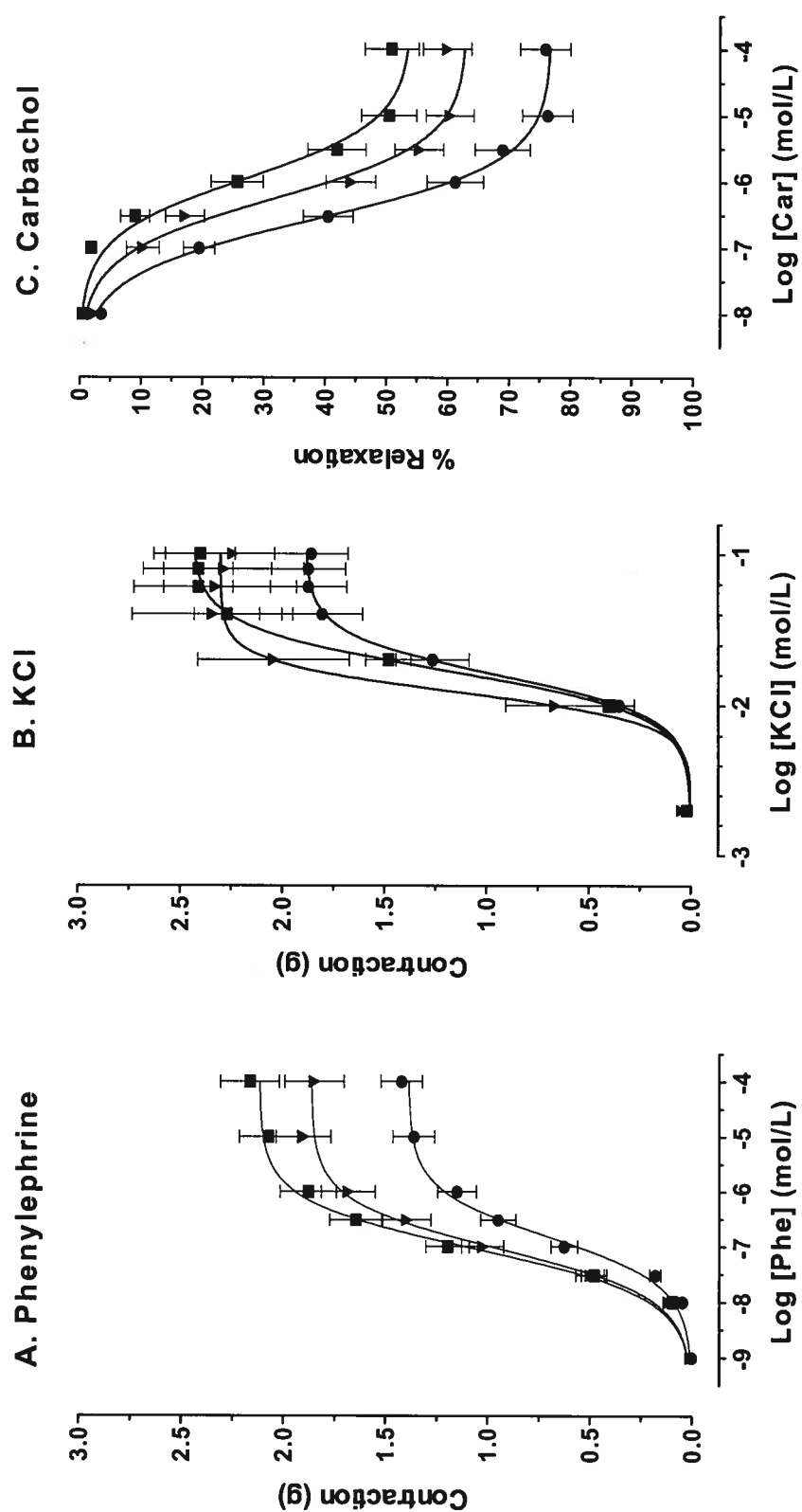
Figure 1

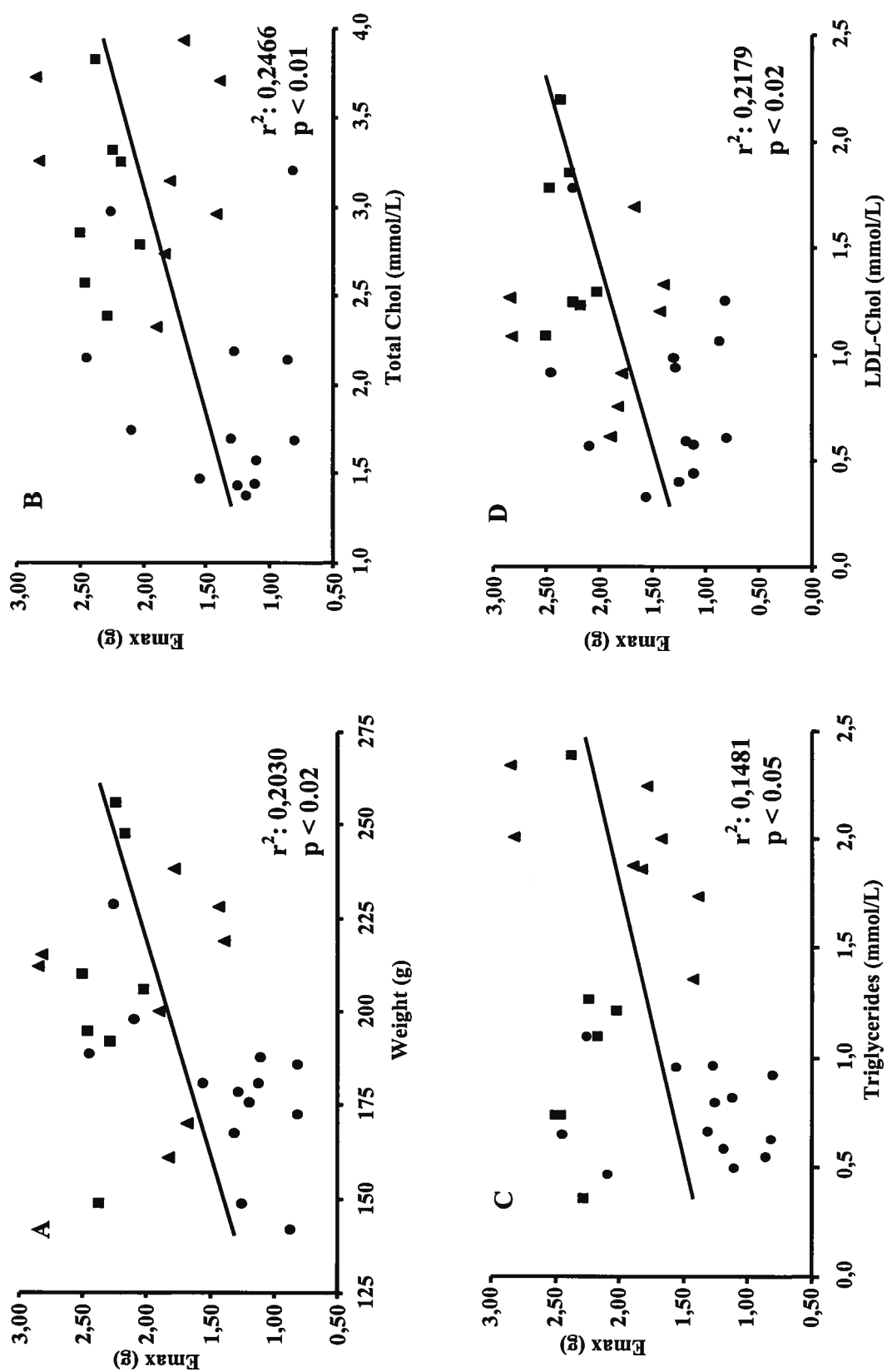
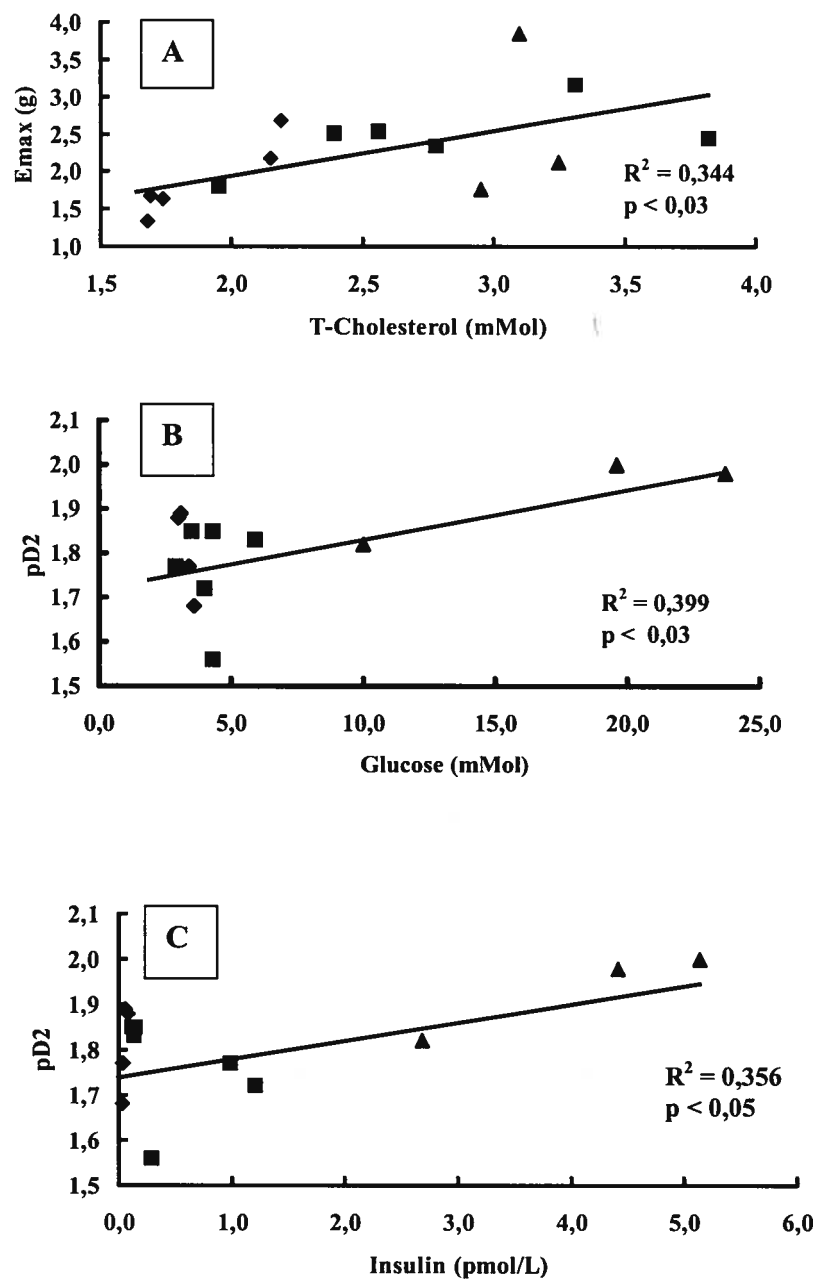
Figure 2

Figure 3

7. Discussion générale

Les connaissances relatives aux événements métaboliques proathérogènes caractéristiques au développement de la résistance à l'insuline et de diabète restent très limitées. Dans notre étude, le *Psammomys obesus*, un modèle expérimental de syndrome de "diaobésité" nous a permis de répondre aux différentes questions que nous nous posions dans ce domaine. En bref, il s'agissait d'examiner l'impact individuel de l'état de résistance à l'insuline et de diabète sur le métabolisme hépatique et périphérique des lipides, ainsi que sur la réactivité de l'endothélium vasculaire étroitement impliqués dans la genèse de l'athérosclérose. Finalement, nous étions intéressés à explorer l'effet du diabète sur la glycosylation des LDL avec leur impact sur des joueurs proathérogéniques. Par ailleurs, à travers notre recherche nous désirions investiguer la pertinence de notre modèle animal dans l'étude des mécanismes des désordres lipidiques en relation avec le diabète. Avant de discuter de nos travaux et de l'interprétation que nous pouvons leur accorder, faisons une brève récapitulation des résultats obtenus.

Premièrement, nous avons caractérisé trois groupes d'animaux selon leur niveau d'insulinémie et de glycémie. Ainsi, par comparaison au groupe témoin (groupe A), nous avons obtenu le groupe des résistants à l'insuline (groupe B) qui est normoglycémique/hyperinsulinémique et le groupe des diabétiques (groupe C) qui présente une hyperglycémie et une hyperinsulinémie. Le passage de l'état contrôle à l'hyperinsulinémie, puis au diabète, est accompagné par une augmentation de poids corporel, essentiellement due à une augmentation de la masse adipeuse. Par ailleurs, les groupes B et C se caractérisent par des anomalies qualitatives et quantitatives des lipides

plasmatiques, telles qu'une hypercholestérolémie, une hypertriglycéridémie, des taux élevés d'acides gras libres, et diverses perturbations de la composition des lipoprotéines. En outre, nous avons relevé, toujours dans les groupes B et C, des dérangements substantiels dans l'activité de l'HMG-CoA-réductase, la 7 α -hydroxylase et l'ACAT, enzymes impliquées dans l'homéostasie hépatique du cholestérol.

Deuxièmement, nos données suggèrent la présence de diverses perturbations du métabolisme hépatique contrôlant l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en TG. Ainsi, dans les groupes B et C, les premières manifestations des anomalies hépatiques se présentent sous forme d'un contenu élevé en lipides (TG, PL, CT), accompagné par une biogenèse et une sécrétion augmentées des lipides, suivis d'une sécrétion accrue des lipoprotéines riches en TG. Par ailleurs, la sécrétion de l'apo B nouvellement synthétisée est élevée dans les groupes B et C, à cause d'une dégradation protéasomique diminuée dans ces deux groupes versus le groupe témoin. En outre, l'activité de la MTP hépatique, protéine de transfert des lipides intracellulaire, ainsi que celles de la MGAT et de la DGAT (enzymes impliquées dans la formation des TG), sont élevées dans les groupes B et C, en comparaison avec le groupe A.

Troisièmement, nous avons remarqué des altérations importantes au niveau du métabolisme intestinal des lipides. Il s'agit, en premier lieu, d'une augmentation du contenu triglycérique de l'intestin chez les animaux hyperinsulinémiques et hyperglycémiques. Ces derniers présentent aussi une élévation du contenu intestinal en cholestérol total. De plus, dans les groupes B et C, la synthèse *de novo* des lipides (TG, PL, CE) et leur sécrétion sont augmentées tout comme les activités de la MGAT et de la

DGAT, les deux enzymes qui appartiennent à la voie de synthèse des TG dans l'entérocyte. Nos données démontrent aussi une biogenèse de l'apo B 48 et une production des lipoprotéines riches en TG accrues dans les groupes B et C en comparaison avec le groupe A. Finalement, en ce qui concerne la MTP, aucune différence n'a été observée dans son activité ou dans son expression protéique. Cependant, nous avons relevé certaines anomalies au niveau des I et L-FABP. Plus exactement, l'expression de I-FABP présente une diminution avec le développement de la résistance à l'insuline et le diabète, tandis que l'expression de L-FABP affiche une apparente augmentation.

Quatrièmement, nos résultats démontrent que l'état de diabète induit des modifications qualitatives et fonctionnelles des LDL. Plus précisément, les animaux diabétiques affichent une augmentation des niveaux des LDL glucosylées de l'ordre de 40 %. Par ailleurs, les LDL glucosylées se caractérisent par des changements dans leur composition (enrichissement en cholestérol ester et phospholipides, et appauvrissement en triglycérides et protéines). En outre, les LDL provenant des animaux diabétiques a) se sont révélées plus chimiotactiques vis à vis des monocytes normaux, b) stimulent l'estérification du cholestérol dans les macrophages, et c) augmentent la sensibilité plaquettaire face à certains agents agrégants, tels que la thrombine, le collagène et l'adénosine diphosphate (ADP).

Cinquièmement, nous avons observé des perturbations significatives dans la réactivité de l'aorte thoracique en réponse à des stimuli vasoconstricteurs et vasodilatateurs chez les animaux résistants à l'insuline et diabétiques. Plus exactement, le développement de la

résistance à l'insuline et le diabète chez les *Psammomys obesus* entraîne une augmentation de la réactivité vasculaire à la phényléphrine (un agent α -adrénergique) et au chlorure de potassium (un agent dépolarisant). De plus, les réponses au carbachol (un stimulus relaxant endothélium- dépendant sont considérablement diminuées chez les animaux résistants à l'insuline et diabétiques par comparaison aux animaux contrôles.

En résumé, les états d'hyperinsulinémie (groupe B) et d'hyperinsulinémie / hyperglycémie (groupe C) par comparaison à l'état normal (groupe A) se caractérisent à différents degrés par :

1. Augmentation du poids corporel
2. Augmentation de la masse adipeuse
3. Hypercholestérolémie
4. Hypertriglycéridémie
5. Augmentation des acides gras libres circulants
6. Altérations dans la composition des lipoprotéines
7. Désordres du métabolisme des lipides hépatiques
 - Contenu lipidique augmenté (TG, PL, CT)
 - Dérangements significatifs des enzymes impliquées dans l'homéostasie du cholestérol
 - Dérangements des enzymes impliquées dans la formation des triglycérides
 - Sécrétion accrue des lipoprotéines riches en TG
 - Synthèse *de novo* des lipides (TG, PL, CE) et sécrétion augmentées
 - Sécrétion accrue de l'apo B nouvellement synthétisée
 - Dégradation diminuée de l'apo B
 - Activité augmentée de la MTP
8. Désordres du métabolisme des lipides intestinaux
 - Contenu lipidique augmenté (TG, CT)
 - Dérangements des enzymes impliquées dans la formation des triglycérides
 - Sécrétion accrue des lipoprotéines riches en TG
 - Biogenèse accrue de l'apo B
 - Synthèse *de novo* des lipides (TG, PL, CE) et sécrétion augmentées
 - Anomalies dans l'expression de L-FABP et I-FABP
9. Altérations de la réactivité vasculaire

De plus, l'état de diabète seul se caractérise par :

1. Niveaux élevés des LDL glucosylées
2. Modifications dans la composition et les propriétés des LDL glucosylées

Le *Psammomys obesus*, appelé souvent le rat de sable à cause de son habitat naturel, offre un modèle très attrayant pour l'investigation du diabète humain induit par une surcharge énergétique. Chez cet animal, le phénotype diabétique apparaît lors d'un changement dans le style de vie. En effet, dans le désert, la consommation calorique est très basse et la dépense physique est très élevée. Au laboratoire, la sédentarité et surtout le transfert de leur régime naturel, constitué des plantes halophiles, à un régime de laboratoire riche en énergie en comparaison à leur régime naturel se traduisent par le développement graduel de l'obésité, de la résistance à l'insuline et finalement du diabète.(381)

Ainsi, dans notre étude, l'exposition des animaux à une diète de laboratoire s'est traduite par l'apparition de l'hyperinsulinémie associée à une prise de poids significative (groupe B). Le maintien d'une glycémie normale dans le groupe B est probablement la conséquence d'une hyperinsulinémie compensatoire.(160,161,279) Finalement, les anomalies peuvent s'aggraver et même les niveaux très élevés d'insuline ne sont plus suffisants pour empêcher l'hyperglycémie (groupe C). Il est intéressant de noter que l'augmentation du poids corporel se fait en absence d'hyperphagie, une observation documentée par une consommation similaire de nourriture.(161,162) Il semble donc que la présence d'un excès relatif de nourriture induit les complications métaboliques mentionnées. Cet état résulte probablement de la présence de la résistance à l'insuline qui représente un trait génétique inhérent aux *Psammomys obesus*.(166) Le métabolisme des ces animaux devient compromis dans des situations de surcharge énergétique, étant donné son incapacité à faire face à un excès d'énergie, ce qui contribue à l'évolution du diabète à l'image des certaines populations humaines, tels que les aborigènes australiens ou les Indiens Pima.(380) Chez ces populations la transition rapide d'une alimentation

faible en énergie à une abondance nutritionnelle et un style de vie sédentaire est caractérisée par une prévalence très élevée de diabète de type 2.(242,308) Ainsi, dans cette première étape de nos travaux, nous avons pu réaffirmer le rôle crucial d'un excès énergétique dans le développement de l'obésité, l'hyperinsulinémie, et ultimement le diabète. Par ailleurs, ces résultats démontrent l'utilité du *Psammomys obesus* dans l'étude du diabète humain. Évidemment, le *Psammomys obesus* n'est pas le seul modèle expérimental de résistance à l'insuline et de diabète. Tout d'abord, mentionnons les souris *ob/ob* et les souris *db/db*, considérées surtout comme des modèles d'obésité, mais aussi de diabète de type 2. Dans les deux cas, le défaut primaire est une mutation spécifique rendant les animaux hyperphagiques, ce qui induit une obésité massive. Plus précisément, chez les souris *ob/ob* il s'agit de la mutation du gène *ob*, codant pour la leptine, une protéine impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire.(375) Chez les souris *db/db*, quant à elles, il s'agit d'une mutation dans le gène *db*, le gène codant pour le récepteur de la leptine.(48) Cependant, à l'heure actuelle, aucune mutation au niveau des ces deux gènes n'a pu être détectée dans l'obésité commune chez les humains.(39,56) Les lignées de rats Goto-Kakisaki et Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) figurent parmi les autres modèles de diabète spontané. La première lignée, créée par Goto et Kakisaki en 1973, présente certains des traits caractéristiques au diabète, telles qu'une hyperglycémie à jeun ainsi qu'une résistance périphérique et hépatique à l'insuline. Toutefois, les animaux de cette lignée ne montrent pas de signe d'obésité.(181) La lignée des rats OLETF, créée en 1991 par Kawano et coll., reproduit certaines des anomalies du diabète humain, qui se développent très tard dans la vie.(171) Par ailleurs, plusieurs chercheurs ont investigué des modèles de diabète induit chimiquement, par l'emploi d'agents destructeurs des cellules β pancréatiques tels que

l'alloxane et la streptozotocine. Toutefois, à des doses élevées, ces agents induisent une déficience insulinémique sévère et une cétoacidose, tandis qu'à des doses diminuées, l'hyperglycémie est légère et stable. De plus, ces modèles représentent surtout le diabète de type 1. En ce qui concerne les modèles d'obésité et de résistance à l'insuline, mentionnons le rat Zucker *fa/fa*, chez lequel est impliquée la mutation du gène *fa*, un homologue du gène *db*.(321) Ces animaux deviennent obèses, hyperinsulinémiques, résistants à l'insuline et hyperlipidémiques, mais ne présentent pas d'hyperglycémie. Cependant, il existe une lignée spécifique des rats Zucker mâles diabétiques, appelée ZDF/GmiTM-*fa* qui, elle, développe l'hyperglycémie.(253) En outre, de plus en plus d'études s'appuient sur le hamster syrien (golden syrien hamster). Ce dernier, nourri par une diète riche en fructose (60% de l'apport total), développe l'obésité et la résistance à l'insuline.(168) Il est évident que ce processus est loin d'être physiologique. Comme nous venons de le voir, de nombreux modèles expérimentaux existent avec leurs avantages et limitations. Cependant, dans la majorité des cas ils ne reflètent pas les caractéristiques, les causes fondamentales et l'évolution du développement du diabète de type 2, à l'image du diabète humain. Par ailleurs, ils n'offrent pas la possibilité d'étudier dans la même lignée l'impact spécifique de la résistance à l'insuline avant l'apparition de l'état diabétique. Dans ce contexte, le *Psammomys obesus*, nous apparaît comme un modèle idéal se rapprochant le plus de syndrome humain de "diaobésité".

Même si diverses études ont procuré des informations intéressantes au sujet du métabolisme de l'insuline et du glucose, chez les *Psammomys obesus*, les connaissances relatives au métabolisme hépatique et périphérique des lipides sont très restreintes.(108,123,162,166) Un fait est certain cependant : les perturbations au niveau

de l'homéostasie des lipides hépatiques accompagnées de la dyslipidémie diabétique contribuent sensiblement à la prévalence des maladies cardiovasculaires dans la population diabétique.(22) Dans ce contexte, le but premier de notre étude était d'évaluer le profil lipidique, la composition des lipoprotéines et le statut lipidique du foie, ainsi que le métabolisme hépatique du cholestérol dans les trois groupes de *Psammomys obesus*.

Nos résultats démontrent l'apparition d'une lipémie hépatique et périphérique marquées et des anomalies lipoprotéïques suivant le passage des animaux de la sensibilité normale à l'insuline à une sensibilité insulinémique altérée puis à l'hyperglycémie. Premièrement, une hypertriglycérémie et une hypercholestérolémie plasmatique se sont développées dans le groupe hyperinsulinémique, mais elles se sont avérées beaucoup plus sévères dans le groupe hyperinsulinémique/hyperglycémique. Deuxièmement, l'hypercholestérolémie a été accompagnée par une augmentation du cholestérol transporté par les VLDL et LDL. Troisièmement, une composition altérée des lipoprotéines, spécialement celles des sous-classes des HDL a été observée dans le groupe hyperglycémique/hyperinsulinémique. Quatrièmement, à l'opposé des lipides circulants, les concentrations hépatiques des triglycérides et du cholestérol étaient plus élevées dans le groupe hyperinsulinémique que dans le groupe hyperinsulinémique/hyperglycémique.

L'hypertriglycérémie se produit fréquemment chez les individus atteints de résistance à l'insuline et chez les patients diabétiques de type 2.(116) Parmi les facteurs connus pour influencer les niveaux des lipoprotéines riches en triglycérides se retrouve la

contribution de la sécrétion hépatique et du catabolisme périphérique médié par la LPL. La lipogenèse hépatique active dans le foie des *Psammomys obesus* hyperinsulinémiques et hyperglycémiques/hyperinsulinémiques a déjà été documentée.(160) De la même façon, des observations antérieures ont montré que la LPL a atteint une activité maximale avec l'émergence de la résistance à l'insuline et qu'elle n'est pas descendue en dessous des valeurs contrôles dans le groupe hyperglycémique/hyperinsulinémique (groupe C).(279,282,381) Compte tenu de ces constatations, l'état d'hypertriglycémie observée dans les groupes B et C devrait être le résultat d'une lipogenèse hépatique dominante plutôt que d'un catabolisme périphérique ralenti. Ceci est bien souligné par les relations directes entre le poids du foie et l'insuline, ainsi qu'avec les TG plasmatiques. Il semblerait donc que dans les groupes B et C, l'hypertriglycémie pourrait résulter d'une sécrétion élevée des lipoprotéines, elle-même causée par la résistance hépatique à l'insuline. En effet, les travaux précédents sur les *Psammomys obesus* ont démontré que les groupes B et C sont caractérisés par une résistance à l'insuline aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau hépatique.(160,161)

Les *Psammomys obesus* des groupes B et C ont aussi manifesté une hypercholestérolémie plasmatique reflétée par des concentrations augmentées du cholestérol véhiculé par les VLDL et LDL. Cette condition hyperlipidémique subséquente à l'élévation de la sécrétion lipoprotéinique par le foie pourrait ajouter aux complications vasculaires décrites par Marquié et al.(214,215) En effet, dans leurs études la progression du diabète chez les *Psammomys obesus* était accompagnée par le développement de la micro- et macro- angiopathie généralisées, incluant

l'épaississement de la membrane basale des capillaires, la fibrose ischémique, l'épaississement de l'intima, les dépôts des glycosaminoglycanes, la présence des cellules spumeuses dans l'intima en plus de l'occurrence des microthrombi. Ainsi, l'enrichissement de l'intima et la media en glycosaminoglycanes peut faciliter l'invasion des lipoprotéines.(214,215) En conséquence, des VLDL et des LDL en fortes concentrations, tel qu'illustré dans notre étude, peuvent pénétrer l'épithélium vasculaire, être captées et retenues par les glycosaminoglycanes. La formation des cellules spumeuses peut s'en suivre, initiant ainsi les premières étapes de la genèse de l'athérosclérose.

Par ailleurs, nous avons remarqué d'importantes altérations dans les activités des trois enzymes contrôlant l'homéostasie du cholestérol hépatique :

1. L'HMG-CoA réductase est une glycoprotéine transmembranaire du réticulum endoplasmique lisse qui régit la biosynthèse hépatique du cholestérol. Certaines études effectuées dans des modèles de diabète induit par la streptozotocine et l'alloxane ont montré une diminution marquée de l'activité de la HMG-CoA réductase, tandis que d'autres ont observé des valeurs normales ou augmentées.(87,120,371) À ce jour, cet aspect n'a pas été résolu, et de plus l'utilisation des modèles de streptozotocine a introduit de nombreuses limitations quant à l'interprétation des résultats obtenus. Dans notre étude, le développement séquentiel de la résistance à l'insuline et du diabète réprime l'activité de cette enzyme, plus particulièrement dans l'état d'hyperinsulinémie.

2. L'ACAT hépatique est l'enzyme responsable de l'estérification du cholestérol. Son rôle dans la résistance à l'insuline, l'obésité et le diabète n'est pas très bien défini. Toutefois, une réduction de son activité a été rapportée dans les modèles de diabète induit chimiquement, suggérant une réserve hépatique limitée du cholestérol estérifié dans le diabète non contrôlé.(248,281) Dans notre étude, les niveaux élevés de l'activité l'ACAT ont été notés dans le groupe B et C, ce qui peut avoir un impact considérable dans l'élaboration des lipoprotéines et le stockage du cholestérol hépatique. D'ailleurs, des quantités élevées de CE hépatique sont retrouvées. Les nombreux travaux effectués dans différents modèles tels que les cellules HepG2 et les hépatocytes des lapins et des hamsters suggèrent que la disponibilité de cholestérol ester est un facteur régulateur important dans l'assemblage et la sécrétion des VLDL.(13,41,376) En accord avec ces observations, l'inhibition de l'ACAT dans les cellules HepG2 a provoqué une diminution de la sécrétion de lipoprotéines contenant l'apo B 100.(226) De même, l'inhibition de l'ACAT chez des lapins hypercholestérolémiques a induit une réduction significative du cholestérol hépatique, des taux plasmatiques des VLDL, des LDL et de l'apo-B 100, résultant en une diminution de l'hypercholestérolémie.(155)

3. La 7α -hydroxylation du cholestérol est une réaction considérée comme la première étape limitante dans la voie de synthèse des acides biliaires.(285) En dépit de son importance dans l'homéostasie du cholestérol, il est difficile d'évaluer sa régulation dans le diabète, compte tenu des résultats divergents qui ont été rapportés.(304,324,325) Notre étude a montré que l'état d'hyperinsulinémie a induit une augmentation de l'activité de la cholestérol 7α -hydroxylase qui s'est poursuivie avec l'augmentation de l'hyperglycémie. Le signal physiologique le plus important dans la régulation de la

cholestérol 7 α -hydroxylase est exercé par la circulation enterohépatique des acides biliaires.(324) Dans le futur, il serait intéressant d'examiner si la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 influencent l'activité de l'enzyme par ces mécanismes.

Dans nos études, le développement de l'hyperglycémie fut devancé par l'apparition d'autres défauts tels que l'hyperinsulinémie, l'obésité, l'hypertriglycéridémie, l'hypercholestérolémie et autres anomalies lipidiques. Ces observations mettent l'accent sur le rapport entre l'hyperinsulinémie et les désordres lipidiques précédant l'éclosion du diabète. Il faut souligner la sévérité des certaines anomalies lipidiques avant même la transition vers l'hyperglycémie. En effet, les LDL plasmatiques, les lipides hépatiques et l'activité de la HMG-CoA réductase ont été plus affectés dans l'état d'hyperinsulinémie dans le groupe B que dans le groupe C. Ces résultats témoignent en faveur des répercussions de l'hyperinsulinémie et de la résistance à l'insuline, qui peuvent pour le moins ressembler dans leur ampleur à l'impact diabétique.

En conclusion de ce premier volet de recherche, nous pouvons dire que nos études ont démontré que la résistance à l'insuline seule et le diabète incontrôlé perturbent l'homéostasie plasmatique et hépatique des stérols. Le modèle animal choisi est particulièrement utile pour investiguer les caractéristiques hépatiques des stérols d'une population en transition vers la résistance à l'insuline et l'obésité, et éventuellement le diabète, dans des conditions environnementales contrôlées et surtout en absence de facteurs confondants.

Comme nous venons de le voir, la résistance à l'insuline et le diabète sont accompagnés, chez le *Psammomys obesus*, par diverses perturbations lipidiques, dont l'hypertriglycémie. Cette dernière est, par ailleurs, l'anomalie lipidique la plus fréquente dans le diabète humain et augmente substantiellement le risque de contracter des complications cardiovasculaires. De la même façon, la résistance à l'insuline est, elle aussi, associée à des taux élevés des TG plasmatiques.(110,114) Même si la régulation des lipoprotéines riches en TG circulantes est un processus très complexe dans le diabète et la résistance à l'insuline, de nombreuses études proposent l'hypothèse du catabolisme altéré et surtout d'une sécrétion augmentée des VLDL hépatiques pour expliquer cette dyslipidémie.(292,296,310) Compte tenu de l'activité élevée de la LPL chez le *Psammomys obesus* résistant à l'insuline et diabétique, le catabolisme ralenti des lipoprotéines riches en TG ne peut être la cause de l'hypertriglycémie, observée chez ces animaux. Dans ce cas, nous nous sommes fixés l'objectif d'examiner, dans les états de résistance à l'insuline et de diabète, certains processus propres à la synthèse et l'assemblage des particules riches en TG d'origine hépatique.

Dans le but de déterminer si une sécrétion hépatique augmentée des VLDL contribue aux niveaux élevés des triglycérides plasmatiques retrouvés chez le *Psammomys obesus* du groupe B et C, nous avons utilisé la méthode de Triton WR-1339.(199) Nos données montrent une élévation du taux de sécrétion des VLDL-TG ainsi qu'une augmentation significative dans le taux de production des VLDL-apoB totales dans les groupes B et C versus le groupe A. Les changements dans la production des VLDL-TG peuvent refléter l'augmentation des TG dans les VLDL, le nombre des particules de VLDL, ou les deux à la fois. Sachant qu'une seule molécule d'apoprotéine

B est sécrétée dans chaque particule de VLDL, la quantité d'apo B dans les VLDL nous fournit une estimation du nombre des particules totales des VLDL sécrétées. Le calcul du ratio apoB/TG nous a permis de constater des valeurs augmentées dans les groupes B et C par rapport au groupe A, ce qui est consistant avec l'augmentation de la sécrétion du nombre des particules des VLDL et non simplement une élévation du contenu en TG dans les VLDL. Nos données suggèrent ainsi que les conditions de la résistance à l'insuline et le diabète modulent le nombre de particules de VLDL.

Un des mécanismes de régulation de la sécrétion de l'apo B est sa lipidation adéquate versus sa dégradation intracellulaire en cas de lipidation insuffisante.(30,67) Nous avons donc décidé d'étudier ces aspects modulateurs dans notre modèle animal afin d'identifier les mécanismes sous-jacents à l'augmentation de l'exocytose de l'apo B dans la résistance à l'insuline et le diabète. Dans un premier étape, nous avons noté que la dégradation de l'apo B était moins marquée dans les hépatocytes du groupe B et C, conduisant à une stimulation de sa sécrétion. D'autre part, nous n'avons pas trouvé de différence appréciable dans la synthèse de l'albumine parmi les trois groupes. Ceci confirme la notion que l'état de résistance à l'insuline et de diabète n'altèrent pas la synthèse protéique totale ou la synthèse spécifique des protéines individuelles telle que l'albumine. Dans l'ensemble, nos expériences semblent suggérer que la résistance à l'insuline et le diabète augmentent la sécrétion de l'apo B nouvellement synthétisée en inhibant sa dégradation dans les hépatocytes. Afin de confirmer ces constatations, nous avons effectué une série d'expériences avec les inhibiteurs du protéasome. L'addition d'ALLN et de la lactacystine a conduit à une stimulation de l'apo B des VLDL libérées par les hépatocytes des 3 groupes d'animaux. Par ailleurs, ces agents chimiques ont

permis aux hépatocytes du groupe A de rattraper l'amplitude de sécrétion de l'apo B observée dans les groupes B et C. Ainsi, il est raisonnable de conclure que la surproduction hépatique de l'apo B notée dans la résistance à l'insuline et le diabète est probablement causée par une réduction de la dégradation de l'apo B. En conformité avec nos observations certains auteurs ont rapporté que la disponibilité accrue des lipides neutres ainsi que l'activité augmentée de la MTP diminuent la dégradation de l'apo B et stimulent sa sécrétion.(30,222) L'apo B une fois synthétisée est sujet à une régulation post-translationnelle, un processus qui est lié de près au statut lipidique de la cellule. L'approvisionnement en lipides joue un rôle important dans la régulation de l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines. En effet, il a été rapporté que la disponibilité de triglycérides, de cholestérol ester et de lysophosphatidylcholine module la sécrétion des lipoprotéines, probablement via la diminution de la dégradation de l'apo B.(13,41,250,377) Dans nos expériences, la quantification du contenu lipidique dans le foie des *Psammomys obesus* a révélé des concentrations augmentées des triglycérides et de cholestérol dans les groupes B et C versus le groupe A. Il est donc possible que les composantes lipidiques protègent l'apo B et la canalisent dans la voie de sécrétion. Les acides gras mobilisés par le tissu adipeux représentent les précurseurs des TG, CE et PL chez nos animaux résistants à l'insuline et diabétiques. Par ailleurs, ces mêmes groupes d'animaux sont caractérisés par une lipogenèse bien élevée. L'ensemble des lipides peut stabiliser l'apo B au niveau du RE, prévenir sa dégradation par la voie du protéasome-ubiquitine et stimuler ainsi l'assemblage et la sécrétion des VLDL.(99,369)

Étant donnée que la GPAT, DGAT et MGAT, forment la triade enzymatique impliquée dans la synthèse des TG nous avons déterminé leurs activités dans les microsomes

isolés.(54) L'activité spécifique de la GPAT est restée relativement inchangée dans les trois groupes. Cette insensibilité de la GPAT est assez surprenante, étant donné que le taux de synthèse *de novo* des acides gras et des TG est étroitement modulé par l'état nutritionnel et le statut hormonal.(306) Cependant, il faut se rappeler que deux isoformes de la GPAT existent. Le premier se trouve dans la membrane extérieure de la mitochondrie et le deuxième sur le réticulum endoplasmique, et seule la GPAT mitochondriale a été rapportée être régulée par les nutriments et les hormones.(79) Dans notre étude, nous nous sommes penchés sur la GPAT dans les microsomes, car le pool microsomal seul est étroitement lié à l'estérification des TG et à la sécrétion des VLDL. Pour l'instant, la fonction de la GPAT mitochondriale est encore très évasive à cause du fait que la mitochondrie est déficiente dans la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse des glycérolipides faisant suite à l'acide lysophosphatidique. Néanmoins, comme suggéré par certains investigateurs, l'induction de la GPAT mitochondriale convertit le fatty acyl-CoA en acide lysophosphatidique dans les tissus lipogéniques et l'empêche ainsi de subir la β -oxydation dans les mitochondries. Par conséquent, les acides gras sont utilisés pour la synthèse des TG.(192) Quant à l'activité de la DGAT, elle a montré une augmentation significative dans le groupe B et a affiché une tendance à l'augmentation dans le groupe C, en comparaison avec le groupe A. Ce résultat va dans le même sens que l'accumulation des TG hépatiques et la production exagérée des VLDL dans les groupes B et C. Cette enzyme est essentielle dans la régulation de la synthèse des TG car elle canalise les "fatty acyl-CoA" vers la voie d'estérification des lipides et d'assemblage des VLDL. IL est donc probable que l'élévation de l'activité hépatique de la DGAT joue un rôle clé dans l'hypertriglycémie hépatique et plasmatique dans les situations de résistance à l'insuline et de diabète. Quoique d'une

importance mineure, la MGAT hépatique procure une voie alternative pour la sécrétion des TG.(54) Dans nos études son activité spécifique était augmentée dans les groupes B et C suggérant que la voie de monoacylglycérol suivant à la synthèse des glycérolipides est aussi induite dans le foie des *Psammomys obesus* résistants à l'insuline et diabétiques. Une préférence marquée de la MGAT pour la sn-2 monoacylglycérol pourrait augmenter son estérification et par ce biais son contenu relatif en TG.

La MTP est une protéine dans la lumière du RE qui facilite le transfert des lipides de leur site de synthèse dans la membrane de RE à la lumière du réticulum durant l'assemblage des lipoprotéines riches en TG.(354) En outre, les études précédentes ont rapporté que la MTP joue un rôle critique dans la régulation post-translationnelle de l'apo B. Des confirmations proviennent des travaux moléculaires. Les mutations de MTP conduisent à un défaut de sécrétion des lipoprotéines riches en TG et à l'absence de l'apo B plasmatique.(284,352) De la même façon, les souris avec un knock-out de MTP exhibent une réduction considérable dans les niveaux de l'apo B 100 plasmatiques à cause d'une sévère altération dans la sécrétion hépatique des lipoprotéines contenant l'apo B.(262,263) De plus, l'utilisation des inhibiteurs de la MTP résulte en une réduction substantielle de l'activité de la MTP accompagnée par une diminution des niveaux des lipoprotéines plasmatiques.(353) Par contre, la surexpression de la MTP hépatique a induit, *in vivo* et *in vitro*, une augmentation significative de la sécrétion de VLDL-TG et des VLDL-apoB.(200,318) Afin d'explorer l'effet présumé de la résistance à l'insuline et du diabète sur la production des lipoprotéines riches en TG, il nous est donc paru intéressant d'étudier l'activité de la MTP. Son analyse hépatique a révélé une augmentation dans les groupes B et C en comparaison avec le groupe A. Ces

observations suggèrent que l'état de résistance à l'insuline et de diabète confère une élévation de l'activité de la MTP hépatique. Nos données sont compatibles avec d'autres travaux montrant que l'activité de la MTP et la sécrétion *in vivo* des TG sont augmentées chez les souris obèses et diabétiques ainsi que dans le modèle de hamster résistant à l'insuline.(17,190) Des études additionnelles sont nécessaires afin de mieux comprendre la régulation de la MTP dans la résistance à l'insuline et le diabète.

Dans l'ensemble, il est raisonnable de conclure que la surproduction hépatique de l'apo B, notée dans la résistance à l'insuline et le diabète chez les *Psammomys obesus*, peut être causée principalement par une réduction de la dégradation de l'apo B. L'excès des acides gras provenant de la lipogenèse et des tissus extra hépatiques pourrait stimuler la synthèse des composantes lipidiques des VLDL et favoriser l'élaboration de l'apo B grâce à l'induction de l'activité de la MTP, ce qui contribuerait à l'hyperlipidémie typique à la résistance à l'insuline et au diabète

La contribution de l'intestin aux dyslipidémies diabétiques est très peu étudiée et souvent sous-estimée. Pourtant, l'accumulation des lipoprotéines résiduelles contenant l'apo B 48 a été retrouvée chez les sujets diabétiques et, de surcroît, a été impliquée dans la progression des maladies athérosclérotiques dans cette population.(256) Dans un volet subséquent, nous avons examiné l'effet de la résistance à l'insuline et du diabète sur le métabolisme intestinal des TG.

En premier lieu, nous avons constaté que les groupes B et C affichaient une augmentation de la production intestinale des lipoprotéines riches en TG. Les mécanismes responsables de ce processus peuvent impliquer, par analogie au foie, la sécrétion de l'apo B et la disponibilité des lipides. En effet, nos résultats ont démontré une stimulation de la biogenèse de l'apo B 48 dans les explants jéjunaux des groupes B et C versus le groupe A. Elle est probablement due à une diminution de la dégradation de l'apo B étant donné que le traitement des tissus avec les inhibiteurs du protéasome a éliminé les différences entre les trois groupes. En ce qui concerne le statut lipidique, il s'est trouvé altéré dans les groupes B et C à cause de l'augmentation du contenu lipidique et de la synthèse et de la sécrétion des lipides neutres dans les groupes B et C en comparaison avec le groupe A. En outre, la biogenèse intestinale des TG se déroule principalement par la voie du monoacylglycérol, impliquant les deux enzymes; la MGAT et la DGAT.(195,271) L'évaluation de leur activité a démontré des taux élevés, ce qui est cohérent avec la synthèse augmentée des TG dans les groupes B et C. Ces résultats reflètent une capacité remarquable de l'intestin à produire des triglycérides et d'autres composantes propres aux lipoprotéines dans les états de résistance à l'insuline et de diabète. D'après nos données, il est donc raisonnable de suggérer que la synthèse augmentée des TG dans l'intestin des *Psammomys obesus* résistants à l'insuline et diabétiques favorise la protection de l'apo B contre la dégradation, ce qui stimule la sécrétion de lipoprotéines riches en TG contenant l'apo B 48.

Nous avons investigué la contribution de la MTP intestinale dans l'hypertriglycémie en vue de son rôle controversé dans l'export de l'apo B 48. En effet, des études récentes ont démontré que les souris ayant un knock-out pour la MTP hépatique, pouvaient toujours sécréter l'apo B 48, excluant la présence obligatoire de la MTP.(262,263) De

plus, l'inhibition de l'activité de la MTP dans les cellules Caco-2 et les cellules McARh7777 a induit une diminution significative de la sécrétion de l'apo B 100, sans affecter celle de l'apo B 48.(129,330,343) Nos résultats montrent également que les entérocytes des *Psammomys obesus* sont capables de libérer plus de lipoprotéines riches en TG dans l'état de résistance à l'insuline et de diabète sans pour autant afficher une augmentation de l'activité de la MTP ou de l'expression de la protéine. Ainsi, nos résultats suggèrent que la MTP intestinale ne contribue pas à la surproduction des lipoprotéines riches en TG contenant l'apo B 48. Cependant, des études additionnelles sont nécessaires afin de définir le rôle de la MTP dans la sécrétion de l'apo B 48, particulièrement dans les états de résistance à l'insuline et de diabète compte tenu des données contradictoires rapportées dans d'autres modèles animaux.(40,255)

Pour conclure ce volet de recherche nous nous sommes arrêtés aux FABP cytosoliques. Ces protéines jouent un rôle critique dans le transport des AG dans l'entérocyte. La signification physiologique de la présence des deux formes de FABP dans les cellules absorbatives n'est pas encore connue.(143,301) Nos données montrent une augmentation des niveaux de L-FABP dans les groupes résistants à l'insuline et diabétiques en parallèle avec une augmentation de la synthèse *de novo* des TG et une élévation de la production des lipoprotéines. Il semblerait donc qu'il existe une relation entre la L-FABP endogène et la sécrétion des lipoprotéines riches en TG, les deux étant induites dans le jéjunum des *Psammomys obesus* résistants à l'insuline et diabétiques. D'un autre côté, l'expression protéique de I-FABP semble diminuée dans les groupes B et C et ne contribue pas à une stimulation de transport intestinal des lipides dans l'état de résistance à l'insuline et le diabète. En accord avec nos données, des études récentes

chez les souris ont suggéré que I-FABP n'est pas essentielle à l'absorption des lipides.(334) Par ailleurs, dans les cellules Caco-2, il a été noté que sa surexpression peut même limiter le transport des lipides intestinaux.(62,112) Sur la base de ces observations, nous suggérons que les conditions de la résistance à l'insuline et du diabète peuvent induire la L-FABP qui, à son tour, peut être impliquée dans le largage des AG dans le RE, stimulant ainsi l'estérification des lipides et l'assemblage des lipoprotéines.

Pour conclure cette partie, nous pouvons dire que l'intestin, comme le foie, est un participant actif dans les hyperlipidémies observées dans les états de résistance à l'insuline et du diabète. D'autres études devraient se pencher sur ce sujet, afin de mieux définir l'approche pharmacologique dans le traitement des dyslipidémies diabétiques.

La glycosylation non enzymatique des protéines a été impliquée dans les complications microvasculaires, mais aussi macrovasculaires associées au diabète.(209) Diverses études ont, en effet, mis l'accent sur son rôle dans le développement de l'athérosclérose dans la population diabétique. La glycosylation non enzymatique des LDL correspond plus précisément à l'attachement par un lien covalent du glucose aux résidus lysines de l'apo B.(209) Plusieurs travaux portant sur ce sujet, ont observé que le pourcentage des LDL glucosylées était plus important chez les sujets diabétiques de type 2 par rapport aux sujets sains. Par ailleurs, des études effectuées *in vitro* ont permis de constater que les LDL glucosylées étaient plus susceptibles à l'oxydation.(33,224) Il faut rappeler que les LDL oxydées sont au cœur de la formation de la plaque d'athérome. De

plus, d'autres observations renforcent le caractère néfaste de la glycosylation des LDL en vue de leur effets sur les macrophages et les plaquettes qui ont un rôle proathérogène.

En premier lieu, nous avons observé une augmentation de 40 % des LDL glycosylées chez les animaux diabétiques par rapport aux animaux témoins. Il a été démontré que les LDL glycosylées ne sont pas aussi bien reconnues que les LDL natives par le récepteur LDL.(320,365) Elles sont alors captées préférentiellement par les macrophages via le récepteur scavenger.(205) Cette captation non régulée des LDL peut induire une accumulation intracellulaire de cholestérol ester et contribuer ainsi au développement des cellules spumeuses. Dans notre étude les LDL provenant des animaux diabétiques se sont révélées 3 fois plus chimiotactiques vis à vis des monocytes normaux chez lesquels elles ont stimulé en plus l'estérification du cholestérol. Ces résultats suggèrent que, dans notre modèle animal, les LDL glycosylées sont préférentiellement reconnues et dégradées par les macrophages. Nos données sont compatibles avec les observations de Lopes-Virella et coll. qui ont démontré que la glycosylation des LDL stimulait la synthèse et l'accumulation du CE dans les macrophages humains.(205) Par ailleurs, les études portant sur les LDL des sujets diabétiques de type 2 ont, elles aussi, révélé une captation accrue des LDL glycosylées par les macrophages et par les cellules intimaes aortiques.(211,290)

Il a été rapporté dans la littérature que les LDL des sujets normaux augmentent la sensibilité des plaquettes aux différents agents agrégants et qu'en outre, les plaquettes provenant des patients diabétiques présentent *in vitro* une sensibilité accrue à l'agrégation.(12,133,137,138) Fermant ce cercle hémostatique, Watanabe et coll. ont

observé que les LDL glucosylées, provenant des patients diabétiques de type 1, induisaient un effet stimulateur plus prononcé sur la réactivité des plaquettes aux agents agrégeants.(346) Nous avons pu observer les mêmes résultats dans un modèle de diabète de type 2. En effet, dans notre étude l'incubation des plaquettes avec des LDL glucosylées s'est traduite par une augmentation significative de leur réactivité vis à vis des agents agrégeants tels que la thrombine, le collagène et l'ADP. Cette constatation est très importante car il est bien connu que l'agrégation des plaquettes est un élément clé dans l'élaboration du thrombus.

Comme nous l'avons mentionné auparavant, la progression du diabète chez les *Psammomys obesus* a été accompagnée par la présence des cellules spumeuses dans l'intima et des microthrombi.(214,215) Il se peut que la glucosylation des LDL, de part son effet stimulateur sur l'accumulation du cholestérol dans les macrophages et la réactivité plaquettaire, représente un des mécanismes responsables de ce phénomène. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si la glucosylation en soi ou autres altérations observées dans la composition des LDL glucosylées sont impliquées dans les altérations biologiques des macrophages et les plaquettes.

Le dysfonctionnement vasculaire est un des phénomènes initiaux dans la genèse de l'athérosclérose. Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré que la fonction d'endothélium présente des altérations très tôt dans le développement du diabète. Cependant, les données relatives à cette observation sont conflictuelles. Les études sur la

réactivité vasculaire chez les rats Zucker obèses présentant une résistance à l'insuline et une hyperlipidémie ont donné des résultats équivoques. Les aortes thoraciques ont exhibé une réactivité normale, diminuée ou augmentée par rapport aux aortes de rats Zucker minces.(10,322,323,374) Dans les modèles de diabète induit par la streptozotocine, les données sont aussi quelque peu contradictoires. Par exemple, certaines études ont observé une diminution de la relaxation endothélium-dépendante, tandis que d'autres n'ont noté aucun effet.(85,317,326) Nos observations montrent pour la première fois des altérations *in vitro* de la réactivité vasculaire dans un modèle animal de résistance à l'insuline et de diabète de type 2. En premier lieu, nous avons noté une augmentation de la contractilité des aortes thoraciques à un agoniste α -adrénergique (la phényléphrine) et à un agent dépolarisant (le KCl) dans les groupes résistants à l'insuline et diabétiques versus le groupe témoin. Nous avons relevé également une augmentation de la sensibilité à la phényléphrine dans les groupes B et C. Afin de comprendre certains des mécanismes responsables de l'augmentation de la réponse aux vasoconstricteurs, nous avons testé l'implication de la relaxation dépendante de l'endothélium en déterminant la courbe de concentration réponse au carbachol. En comparaison avec le groupe témoin, les groupes B et C ont présenté une diminution dans la réponse maximale et de la sensibilité au carbachol. Nos résultats concordent avec ceux obtenus dans les anneaux aortiques des rats BB diabétiques qui affichent une diminution de la relaxation endothélium- dépendante au A23187 et à l'acétylcholine.(85,220) Par ailleurs, nos données suggèrent que l'élévation relative de la réponse aux vasoconstricteurs observée dans les groupes B et C peut être médiée, au moins en partie, par des altérations de la fonction endothéliale. En effet, la contraction à la phényléphrine était plus importante tandis la relaxation induite par le carbachol l'était moins dans les

anneaux aortiques du groupe B par rapport au groupe C. Il est bien connu que la réponse adrénergique augmente proportionnellement à la destruction relative de la fonction endothéliale. De même, dans les groupes B et C, l'amplitude de l'augmentation de la réponse à la phényléphrine et au KCl se reflète dans le degré de la diminution de la vasorelaxation endothéliale. Cette observation a déjà été rapportée par St-Louis et coll., et elle témoigne de la relation entre les altérations de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium et de la contractilité.(300)

Il a été rapporté dans la littérature que certaines dyslipidémies autant chez les animaux que chez les humains, peuvent perturber la réactivité vasculaire de l'endothélium.(52,198) Dans notre étude, nous avons observé une corrélation positive entre la contraction maximale (Emax) à la phényléphrine d'une part, et le poids, le CT, les TG et LDL-cholestérol, d'autre part. De même, nous avons noté une relation entre la contraction maximale (Emax) au KCl et le CT. Il est donc possible que, chez les *Psammomys obesus* résistants à l'insuline et diabétiques, l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie plasmatiques contribuent en partie aux altérations de la relaxation endothélium-dépendante.

En conclusion, nos données montrent que, chez le *Psammomys obesus*, les états de résistance à insuline et de diabète se caractérisent par une réactivité accrue aux vasoconstricteurs. Cette dernière peut être médiée en partie par des altérations notées au niveau de la relaxation endothélium-dépendante. Certaines dyslipidémies, accompagnant les deux états semblent participer dans ces perturbations. Par ailleurs, rappelons que toutes les altérations de la réactivité vasculaire sont déjà présentes dans l'état de résistance

à l'insuline et n'ont pas affiché d'exacerbation avec la complication diabétique. Sachant que l'insuline est une hormone vasodilatatrice puissante, nous pouvons suggérer que la résistance à l'action de l'insuline est le facteur pathologique principal dans les altérations vasculaires observées. D'ailleurs, l'étude réalisée chez les rats Zucker a noté que l'incubation des aortes thoraciques avec l'insuline a atténué de façon significative la réponse contractile à la phényléphrine, et ce aussi bien chez les animaux normaux que chez les animaux obèses et résistants à l'insuline. Cependant, chez les rats témoins, l'effet de l'insuline sur la réduction de la réponse contractile était 2.5 fois plus prononcée que chez les résistants à l'insuline.(374)

Nos travaux, décrits ci-haut, nous ont amenés à documenter dans les états de résistance à l'insuline et de diabète de nombreux dérangements du métabolisme lipidique et de la fonction vasculaire. Par ailleurs, nous avons eu l'opportunité de les évaluer aux différents sites : la circulation sanguine, l'intestin, l'aorte et le foie. L'intégration de l'ensemble de nos données nous permet de proposer un schéma des altérations globales contribuant à la genèse des complications athérosclérotiques retrouvées dans ces deux désordres.

Chez le *Psammomys obesus*, les états de résistance à l'insuline et de diabète se caractérisent par des dyslipidémies plasmatiques potentiellement athérogènes telles qu'une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie. Elles semblent refléter diverses altérations du métabolisme lipidique au niveau intestinal et hépatique. Dans un premier temps, l'état de résistance à l'insuline et de diabète est accompagné par des

perturbations des voies métaboliques contrôlant l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines d'origine intestinale résultant en une sécrétion accrue des chylomicrons. Nous pouvons supposer qu'une augmentation des chylomicrons circulants donnera naissance à une concentration élevée des particules résiduelles des chylomicrons. En outre, dans la physiologie normale, les chylomicrons résiduels sont épurés de la circulation par le foie après avoir interagi avec des récepteurs spécifiques. Cependant, un ralentissement de la clairance des résidus de chylomicrons plasmatiques a été rapportée dans le diabète.(196) En vue de ces observations et de nos données, nous pouvons suggérer que la présence des taux élevés des particules résiduelles des chylomicrons notés chez les sujets diabétiques résulte d'une surproduction intestinale et d'un catabolisme hépatique ralenti. Parmi les causes induisant la biogenèse élevée des lipoprotéines au niveau intestinal les taux élevés des AGL circulants, peuvent certainement stimuler la lipogenèse intestinale qui à son tour activera l'assemblage des lipoprotéines. Le catabolisme hépatique ralenti peut, quant à lui, être provoqué par l'hypertriglycémie à l'état de jeun suite à une compétition entre les résidus de chylomicrons et de VLDL hépatiques.(196) Rappelons que le séjour prolongé des résidus de chylomicrons constitue un risque cardiovasculaire important.

Les résidus de chylomicrons qui arriveront à pénétrer le foie livreront tout leur contenu lipidique aux hépatocytes. L'augmentation du cholestérol hépatique qui s'en suit peut inhiber la synthèse endogène de cholestérol, ce qui a été confirmé par la détermination de l'activité de la HMG-CoA réductase, notée abaissée chez les animaux résistants à l'insuline et diabétiques. En parallèle, une activation de l'estérification de cholestérol prend place, telle qu'observée par l'activité augmentée de l'ACAT. Rappelons que le

cholestérol estérifié renforcera les réserves intracellulaires, et il stimulera de façon marquée l'assemblage et la sécrétion des VLDL. La dernière enzyme impliquée dans l'homéostasie du cholestérol hépatique est la cholestérol 7 α -hydroxylase dont l'activité est aussi augmentée chez les *Psammomys obesus* résistants à l'insuline et diabétiques. Il a été rapporté que les sujets diabétiques peuvent présenter des altérations au niveau de la motilité de la vésicule biliaire et des calculs biliaires, qui ont le potentiel de conduire à l'obstruction des voies ductulaires.(46,130) Dans ce cas, un retour réduit des acides biliaires se traduit par une inhibition de l'activité de la 7 α -hydroxylase, résultat qu'on ne trouve pas dans nos études. Il se peut que l'augmentation de l'activité de cette enzyme reflète en fait un métabolisme des acides biliaires tout à fait différent dans les situations de la résistance à l'insuline et du diabète. Par exemple, des acides biliaires de composition différente de l'état normal constitueraient un signal inducteur plutôt que répresseur.

En outre, chez le *Psammomys obesus* résistants à l'insuline et diabétique, le foie ne se caractérise pas uniquement par des anomalies du cholestérol hépatique, mais comme c'était le cas pour l'intestin, il présente diverses perturbations menant à une surproduction des lipoprotéines riches en TG. Les causes principales semblent impliquer une lipogenèse augmentée, elle-même probablement due à un afflux accru des AGL plasmatiques et des composantes lipidiques originant des chylomicrons résiduels. Comme nous l'avons déjà mentionné, la disponibilité augmentée des lipides diminue la dégradation de l'apo B et conduit à un assemblage et une sécrétion amplifiées des VLDL. Ces derniers étant des précurseurs métaboliques des LDL, on s'attendra donc à une augmentation des LDL plasmatiques. Le résultat final est à la fois une

hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie, telles que notées chez nos animaux résistants à l'insuline et diabétique. Ainsi, dans l'état de résistance à l'insuline et de diabète, il semblerait que les dérangements lipidiques relèvent surtout de la sécrétion exagérée des lipoprotéines par le foie et par l'intestin. Ces conditions peuvent donc contribuer à l'hyperlipidémie et au développement de la dysfonction vasculaire, observées chez les mêmes animaux. L'hyperglycémie de son côté alourdit le profil proathérogène déjà en place, surtout par le phénomène de glucosylation des LDL.

En conclusion, chez le *Psammomys obesus* l'état prédiabétique et diabétique se caractérisent par l'hyperlipidémie, le dysfonctionnement vasculaire et la glucosylation des LDL qui individuellement représentent un risque des complications cardiovasculaires. Sur la base de nos observations, nous pouvons considérer l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline comme des déterminants dynamiques dans l'éclosion des anomalies métaboliques des lipides et des altérations vasculaires.

8. Références

1. Adler JH, Kalman R, Lazarovici G et al. Achieving predictable model of Type 2 diabetes in sand rats. In : Shafrir E, ed., *Lessons from animal diabetes*, London, Smith-Gordon, 1991, 3, 212-214.
2. Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA* 1999 Oct 27;282(16):1530-8.
3. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997;14 Suppl 5:S1-85.
4. Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J Clin Invest* 1991 Jun;87(6):2246-52.
5. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002 Apr 18;346(16):1221-31.
6. Arner P, Pollare T, Lithell H, Livingston JN. Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1987 Jun;30(6):437-40.
7. Ashby P, Robinson DS. Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipids. *Biochem J*. 1980 Apr 15;188(1):185-92.
8. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the

- Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 Aug;19(8):1819-24.
9. Astrup A, Finer N. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? *Obes Rev* 2000 Oct;1(2):57-9.
 10. Auguet, M., Delaflotte, S., Braquet, P., 1989. Increased influence of endothelium in obese Zucker rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* 41, 861-864.
 11. Austin MA. Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler Thromb.* 1991 Jan-Feb;11(1):2-14.
 12. Aviram M, Brook JG. Platelet interaction with high and low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1983 Mar;46(3):259-68.
 13. Avramoglu RK, Cianflone K, Sniderman AD. Role of the neutral lipid accessible pool in the regulation of secretion of apoB-100 lipoprotein particles by HepG2 cells. *J Lipid Res.* 1995 Dec;36(12):2513-28.
 14. Barnett M, Collier GR, Zimmet P, O'Dea K. The effect of restricting energy intake on diabetes in *Psammomys obesus*. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994 Dec;18(12):789-94.
 15. Baron AD. Vascular reactivity. *Am J Cardiol.* 1999 Jul 8;84(1A):25J-27J.
 16. Bar-On H, Ben-Sasson R, Ziv E, Arar N, Shafir E. Irreversibility of nutritionally induced NIDDM in *Psammomys obesus* is related to beta-cell apoptosis. *Pancreas* 1999 Apr;18(3):259-65.
 17. Bartels ED, Lauritsen M, Nielsen LB. Hepatic expression of microsomal triglyceride transfer protein and in vivo secretion of triglyceride-rich lipoproteins are increased in obese diabetic mice. *Diabetes.* 2002 Apr;51(4):1233-9.

18. Basdevant A. Obésité : épidémiologie et santé publique. *Ann Endocrinol (Paris)* 2000 Dec;61 Suppl 6:6-11.
19. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 2001 Dec 13;414(6865):788-91.
20. Bendayan M, Malide D, Ziv E, Levy E, Ben-Sasson R, Kalman R, Bar-On H, Chretien M, Seidah N. Immunocytochemical investigation of insulin secretion by pancreatic beta-cells in control and diabetic *Psammomys obesus*. *J Histochem Cytochem* 1995 Aug;43(8):771-84.
- 20a. Bergman RN, Phillips LS, Cobelli C. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man: measurement of insulin sensitivity and beta-cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose. *J Clin Invest* 1981 Dec;68(6):1456-67.
21. Betteridge DJ. LDL heterogeneity: implications for atherogenicity in insulin resistance and NIDDM. *Diabetologia* 1997 Jul;40 Suppl 2:S149-51.
22. Betteridge DJ. Diabetic dyslipidemia. *Eur J Clin Invest* 1999;29(Suppl. 2):12-16.
23. Birmingham CL, Muller JL, Palepu A, Spinelli JJ, Anis AH. The cost of obesity in Canada. *CMAJ* 1999 Feb 23;160(4):483-8.
24. Björkerud B; Björkerud S. Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:416-424.
25. Black DD. Intestinal lipoprotein metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995 Feb;20(2):125-47.
26. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest.* 1994 Jun;93(6):2438-46.

27. Boden G. Pathogenesis of type 2 diabetes. Insulin resistance. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001 Dec;30(4):801-15.
28. Bonadonna RC, Del Prato S, Bonora E, Saccomani MP, Gulli G, Natali A, Frascerra S, Pecori N, Ferrannini E, Bier D, Cobelli C, DeFronzo RA. Roles of glucose transport and glucose phosphorylation in muscle insulin resistance of NIDDM. *Diabetes*. 1996 Jul;45(7):915-25.
29. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2000 Jan;23(1):57-63.
30. Borchardt RA, Davis RA. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion. *J Biol Chem* 1987 Dec 5;262(34):16394-402.
31. Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*. 1990 May 24;322(21):1477-82.
32. Bouchard C, Tremblay A. Genetic influences on the response of body fat and fat distribution to positive and negative energy balances in human identical twins. *J Nutr*. 1997 May;127(5 Suppl):943S-947S.
33. Bowie A, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? *Atherosclerosis* 1993 Aug;102(1):63-7.

34. Bray GA, Popkin BM. Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr.* 1998 Dec;68(6):1157-73.
35. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986 Apr 4;232(4746):34-47.
36. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 1976 Jan 16;191(4223):150-4.
37. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
38. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, King GL, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999 Sep;48(9):1856-62.
39. Carlsson B, Lindell K, Gabrielsson B, Karlsson C, Bjarnason R, Westphal O, Karlsson U, Sjostrom L, Carlsson LM. Obese (ob) gene defects are rare in human obesity. *Obes Res* 1997 Jan;5(1):30-5.
40. Carpentier A, Taghibiglou C, Leung N, Szeto L, Van Iderstine SC, Uffelman KD, Buckingham R, Adeli K, Lewis GF. Ameliorated hepatic insulin resistance is associated with normalization of microsomal triglyceride transfer protein expression and reduction in very low density lipoprotein assembly and secretion in the fructose-fed hamster. *J Biol Chem.* 2002 Aug 9;277(32):28795-802.
41. Cartwright IJ, Higgins JA, Wilkinson J, Bellavia S, Kendrick JS, Graham JM. Investigation of the role of lipids in the assembly of very low density lipoproteins in rabbit hepatocytes. *J Lipid Res.* 1997 Mar;38(3):531-45.
42. Cavallero E, Brites F, Delfly B, Nicolaiew N, Decossin C, De Geitere C, Fruchart JC, Wikinski R, Jacotot B, Castro G. Abnormal reverse cholesterol transport in

- controlled type II diabetic patients. Studies on fasting and postprandial LpA-I particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 Dec;15(12):2130-5.
43. Cefalu WT. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001 Jan;226(1):13-26.
44. Chajek-Shaul T, Ziv E, Friedman G, Etienne J, Adler J. Regulation of lipoprotein lipase activity in the sand rat: effect of nutritional state and cAMP modulation. *Metabolism* 1988 Dec;37(12):1152-8.
45. Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care*. 1994 Sep;17(9):961-9.
46. Chapman BA, Wilson IR, Frampton CM, Chisholm RJ, Stewart NR, Eagar GM, Allan RB. Prevalence of gallbladder disease in diabetes mellitus. *Dig Dis Sci* 1996 Nov;41(11):2222-8.
47. Chiappe de Cingalani GE, Goers JW, Giannotti M, Caldiz CI. Comparative effects of insulin and isoproterenol on lipoprotein lipase in rat adipose cells. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 1):C1461-7.
48. Chua SC Jr, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 1996 Feb 16;271(5251):994-6.
49. Clark CM Jr, Lee DA. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995 May 4;332(18):1210-7.
50. Claycombe KJ, Jones BH, Standridge MK, Guo Y, Chun JT, Taylor JW, Moustaid-Moussa N. Insulin increases fatty acid synthase gene transcription in human adipocytes. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 2):R1253-9.

51. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 1999 Jul 22;341(4):240-6.
- 51a. Cobelli C, Bettini F, Caumo A, Quon MJ. Overestimation of minimal model glucose effectiveness in presence of insulin response is due to undermodeling. *Am J Physiol* 1998 Dec;275(6 Pt 1):E1031-6.
52. Cohen RA, Zitnay KM, Haudenschild CC, Cunningham LD. Loss of selective endothelial cell vasoactive functions caused by hypercholesterolemia in pig coronary arteries. *Circ Res* 1988 Nov;63(5):903-10.
53. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Arky RA, Speizer FE. Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am J Epidemiol*. 1990 Sep;132(3):501-13.
54. Coleman RA, Lewin TM, Muoio DM. Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr* 2000;20:77-103.
55. Consensus Development Conference on Insulin Resistance. 5-6 November 1997. American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 1998 Feb;21(2):310-4.
56. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes* 1996 Jul;45(7):992-4.
57. Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A, Bouchard C, Mauriege P, Despres JP. Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* 1998 Jun;47(6):953-60.

58. Cuatrecasas P. Insulin--receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971 Jun;68(6):1264-8.
59. Cui MZ, Penn MS, Chisolm GM. Native and oxidized low density lipoprotein induction of tissue factor gene expression in smooth muscle cells is mediated by both Egr-1 and Sp1. *J Biol Chem* 1999 Nov 12;274(46):32795-802.
60. Damsbo P, Vaag A, Hother-Nielsen O, Beck-Nielsen H. Reduced glycogen synthase activity in skeletal muscle from obese patients with and without type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1991 Apr;34(4):239-45.
61. Dananberg J, Caro JF. Obesity, chapter 44, 615-631 In: *Endocrinology*, fourth edition by DeGroot LJ and Jameson JL. 2001.
62. Darimont C, Gradoux N, Persohn E, Cumin F, De Pover A. Effects of intestinal fatty acid-binding protein overexpression on fatty acid metabolism in Caco-2 cells. *J Lipid Res*. 2000 Jan;41(1):84-92.
63. Dashti N, Williams DL, Alaupovic P. Effects of oleate and insulin on the production rates and cellular mRNA concentrations of apolipoproteins in HepG2 cells. *J Lipid Res* 1989 Sep;30(9):1365-73.
64. Davidson NO, Shelness GS. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:169-93.
65. Davignon J, Genest J Jr. Genetics of lipoprotein disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998 Sep;27(3):521-50.
66. Davis CE, Gordon D, LaRosa J, Wood PD, Halperin M. Correlations of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels with other plasma lipid and lipoprotein concentrations. *Circulation* 1980 Nov;62(4 Pt 2):IV24-30.

67. Davis RA, Thrift RN, Wu CC, Howell KE. Apolipoprotein B is both integrated into and translocated across the endoplasmic reticulum membrane. Evidence for two functionally distinct pools. *J Biol Chem* 1990 Jun 15;265(17):10005-11.
68. Davis RA. Cell and molecular biology of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by the liver. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Aug 25;1440(1):1-31.
69. de Graaf J, Hak-Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to *in vitro* oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb* 1991 Mar-Apr;11(2):298-306.
70. de Graaf J, Hak-Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to *in vitro* oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb* 1991 Mar-Apr;11(2):298-306.
71. de Graaf J, Hendriks JC, Demacker PN, Stalenhoef AF. Identification of multiple dense LDL subfractions with enhanced susceptibility to *in vitro* oxidation among hypertriglyceridemic subjects. Normalization after clofibrate treatment. *Arterioscler Thromb* 1993 May;13(5):712-9.
72. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*. 1992 Mar;15(3):318-68.
73. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979 Sep;237(3):E214-23.

74. DeJager S, Bruckert E, Chapman MJ. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 1993 Feb;34(2):295-308.
75. Del Prato S. Measurement of insulin resistance in vivo. *Drugs.* 1999;58 Suppl 1:3-6; discussion 75-82.
76. Demant T, Bedford D, Packard CJ, Shepherd J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipemic subjects. *J Clin Invest* 1991 Nov;88(5):1490-501.
77. Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I, Ares MP, Banfi C, Calara F, Hamsten A, Eriksson P, Nilsson J. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells. *Circ Res.* 1999 May 14;84(9):1085-94.
78. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* 1993 Oct;34(10):1637-59.
79. Dircks LK, Sul HS. Mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Sep 4;1348(1-2):17-26.
80. Dixon JL, Furukawa S, Ginsberg HN. Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 1991 Mar 15;266(8):5080-6.
81. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 1999 Apr;48(4):738-44.
82. Dorrestijn J, van Bussel FJ, Maassen JA, Gomes de Mesquita DS. Early steps in insulin action. *Arch Physiol Biochem.* 1998 Oct;106(4):269-89.

83. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):253-9.
84. Dullaart RP, Sluiter WJ, Dikkeschei LD, Hoogenberg K, Van Tol A. Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism. *Eur J Clin Invest* 1994 Mar;24(3):188-94.
85. Durante W, Sen AK, Sunahara FA. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br. J. Pharmacol*. 1988 Jun;94(2):463-8.
86. Dzau VJ, Gibbons GH. Endothelium and growth factors in vascular remodeling of hypertension. *Hypertension* 1991 Nov;18(5 Suppl):III115-21.
87. Easom RA, Zammit VA. Effects of diabetes on the expressed and total activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver in vivo. Reversal by insulin treatment. *Biochem J* 1985 Sep 15;230(3):747-52.
88. el-Maghrabi MR, Lange AJ, Kummel L, Pilkis SJ. The rat fructose-1,6-bisphosphatase gene. Structure and regulation of expression. *J Biol Chem*. 1991 Feb 5;266(4):2115-20.
89. el-Maghrabi MR, Pilkis J, Marker AJ, Colosia AD, D'Angelo G, Fraser BA, Pilkis SJ. cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(22):8430-4.

90. Engerman RL, Kern TS, Larson ME. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia* 1994 Feb;37(2):141-4.
91. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Jan;18(1):20-6.
92. Erkelens DW. Diabetic dyslipidaemia. *Eur Heart J* 1998 Jul;19 Suppl H:H27-40.
93. Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Pieraggi MT, Arnal JF, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Feb;17(2):331-9.
94. Everhart JE, Pettitt DJ, Bennett PH, Knowler WC. Duration of obesity increases the incidence of NIDDM. *Diabetes.* 1992 Feb;41(2):235-40.
95. Faber OK, Binder C. C-peptide: an index of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev.* 1986;2(3-4):331-45.
96. Felber JP, Golay A. De l'obésité au diabète. *Ann Endocrinol (Paris).* 1995;56(5):531-8.
97. Ferrannini E, Mari A. How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens.* 1998 Jul;16(7):895-906.
98. Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *J Clin Invest.* 1997 Sep 1;100(5):1166-73.

- 98a. Finegood DT, Tzur D. Reduced glucose effectiveness associated with reduced insulin release: an artifact of the minimal-model method. *Am J Physiol* 1996 Sep;271(3 Pt 1):E485-95.
99. Fisher EA, Zhou M, Mitchell DM, Wu X, Omura S, Wang H, Goldberg AL, Ginsberg HN. The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *J Biol Chem*. 1997 Aug 15;272(33):20427-34.
100. Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998 Jan;22(1):39-47.
101. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2000. *JAMA*. 2002 Oct 9;288(14):1723-7.
102. Fleischhacker E, Esenabhalu VE, Spitaler M, Holzmann S, Skrabal F, Koidl B, Kostner GM, Graier WF. Human diabetes is associated with hyperreactivity of vascular smooth muscle cells due to altered subcellular Ca²⁺ distribution. *Diabetes*. 1999 Jun;48(6):1323-30.
103. Flier JS, Mantzoros C. Syndrome of insulin resistance and mutant insulin: chapter 56: 799-809 In: *Endocrinology*, fourth edition by DeGroot LJ and Jameson JL. 2001.
104. Ford ES, Williamson DF, Liu S. Weight change and diabetes incidence: findings from a national cohort of US adults. *Am J Epidemiol*. 1997 Aug 1;146(3):214-22.
105. Frenais R, Ouguerram K, Maugeais C, Mahot P, Maugere P, Krempf M, Magot T. High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia* 1997 May;40(5):578-83.

106. Freychet P, Roth J, Neville DM Jr. Insulin receptors in the liver: specific binding of (125 I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971 Aug;68(8):1833-7.
107. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jun;280(6):E827-47.
108. Gadot M, Leibowitz G, Shafrir E, Cerasi E, Gross DJ, Kaiser N. Hyperproinsulinemia and insulin deficiency in the diabetic *Psammomys obesus*. *Endocrinology* 1994 Aug;135(2):610-6.
109. Galeano NF, Milne R, Marcel YL, Walsh MT, Levy E, Ngu'yen TD, Gleeson A, Arad Y, Witte L, al-Haideri M, et al. Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size. *J Biol Chem* 1994 Jan 7;269(1):511-9.
110. Garg A, Haffner SM. Insulin resistance and atherosclerosis. *Diabetes Care* 1996 Mar;19(3):274.
111. Gaw A, Packard CJ, Lindsay GM, Griffin BA, Caslake MJ, Lorimer AR, Shepherd J. Overproduction of small very low density lipoproteins (Sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: relationships between apolipoprotein B kinetics and plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1995 Jan;36(1):158-71.
112. Gedde-Dahl A, Kulseth MA, Ranheim T, Drevon CA, Rustan AC. Reduced secretion of triacylglycerol in CaCo-2 cells transfected with intestinal fatty acid-binding protein. *Lipids* 2002 Jan;37(1):61-8.

113. Gerich JE. Is reduced first-phase insulin release the earliest detectable abnormality in individuals destined to develop type 2 diabetes? *Diabetes*. 2002 Feb;51 Suppl 1:S117-21.
114. Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia: basic mechanisms underlying the common hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol levels. *Diabetes* 1996 Jul;45 Suppl 3:S27-30.
115. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(4):453-8.
116. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care*. 1991 Sep;14(9):839-55.
117. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998 Sep;27(3):503-19.
118. Girard J. Acides gras et cellule β . *Diabetes Metab*. 2000 Jun;26 Suppl 3:6-9.
119. Girard J. Fondements physiologiques du diabète de type 2. *Rev Prat* 1999 Jan 1;49(1):22-9.
120. Goodman MW, Michels LD, Keane WF. Intestinal and hepatic cholesterol synthesis in the alloxan diabetic rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982 Jul;170(3):286-90
121. Gordon DA, Jamil H, Gregg RE, Olofsson SO, Boren J. Inhibition of the microsomal triglyceride transfer protein blocks the first step of apolipoprotein B lipoprotein assembly but not the addition of bulk core lipids in the second step. *J Biol Chem*. 1996 Dec 20;271(51):33047-53.
122. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC Jr, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for

- healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1999 Sep 7;100(10):1134-46.
123. Habito RC, Barnett M, Yamamoto A, Cameron-Smith D, O'Dea K, Zimmet P, Collier GR. Basal glucose turnover in *Psammomys obesus*. An animal model of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 1995 Oct;32(3):187-92.
 124. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998 Jul 23;339(4):229-34.
 125. Haffner SM, Mykkanen L, Stern MP, Paidi M, Howard BV. Greater effect of diabetes on LDL size in women than in men. *Diabetes Care* 1994 Oct;17(10):1164-71.
 126. Haffner SM, Mykkanen L, Valdez RA, Stern MP, Holloway DL, Monterrosa A, Bowsher RR. Disproportionately increased proinsulin levels are associated with the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Dec;79(6):1806-10.
 127. Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *JAMA*. 1990 Jun 6;263(21):2893-8.
 128. Haffner SM. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *Diabetes Care* 1998 Jan;21(1):160-78.
 129. Haghighpassand M, Wilder D, Moberly JB. Inhibition of apolipoprotein B and triglyceride secretion in human hepatoma cells (HepG2). *J Lipid Res* 1996 Jul;37(7):1468-80.

130. Hahm JS, Park JY, Park KG, Ahn YH, Lee MH, Park KN. Gallbladder motility in diabetes mellitus using real time ultrasonography. *Am J Gastroenterol* 1996 Nov;91(11):2391-4.
131. Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelman KD, Kohen-Avramoglu R, Lewis GF, Adeli K. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):31646-55.
132. Halse R, Rochford JJ, McCormack JG, Vandenheede JR, Hemmings BA, Yeaman SJ. Control of glycogen synthesis in cultured human muscle cells. *J Biol Chem*. 1999 Jan 8;274(2):776-80.
133. Halushka PV, Rogers RC, Loadholt CB, Colwell JA. Increased platelet thromboxane synthesis in diabetes mellitus. *J Lab Clin Med* 1981 Jan;97(1):87-96.
134. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 15;88(24):11555-8.
135. Han TS, van Leer EM, Seidell JC, Lean ME. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample. *BMJ*. 1995 Nov 25;311(7017):1401-5.
136. Hanley AJ, D'Agostino R Jr, Wagenknecht LE, Saad MF, Savage PJ, Bergman R, Haffner SM. Increased proinsulin levels and decreased acute insulin response independently predict the incidence of type 2 diabetes in the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1263-70.

- 136a. Harano Y, Ohgaku S, Hidaka H, Haneda K, Kikkawa R, Shigeta Y, Abe H. Glucose, insulin and somatostatin infusion for the determination of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1977 Nov;45(5):1124-7.
137. Hassall DG, Forrest LA, Bruckdorfer KR, Marenah CB, Turner P, Cortese C, Miller NE, Lewis B. Influence of plasma lipoproteins on platelet aggregation in a normal male population. *Arteriosclerosis* 1983 Jul-Aug;3(4):332-8.
138. Hassall DG, Owen JS, Bruckdorfer KR. The aggregation of isolated human platelets in the presence of lipoproteins and prostacyclin. *Biochem J* 1983 Oct 15;216(1):43-9.
- 138a. Heine RJ, Home PD, Poncher M, Orskov H, Hammond V, McCulloch AJ, Hanning I, Alberti KG. A comparison of 3 methods for assessing insulin sensitivity in subjects with normal and abnormal glucose tolerance. *Diabetes Res* 1985 May;2(3):113-20.
139. Henry RR, Abrams L, Nikoulina S, Ciaraldi TP. Insulin action and glucose metabolism in nondiabetic control and NIDDM subjects. Comparison using human skeletal muscle cell cultures. *Diabetes*. 1995 Aug;44(8):936-46.
140. Henry RR, Ciaraldi TP, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Park KS, Nikoulina SE. Glycogen synthase activity is reduced in cultured skeletal muscle cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *Biochemical and molecular mechanisms. J Clin Invest*. 1996 Sep 1;98(5):1231-6.
141. Horowitz BS, Goldberg IJ, Merab J, Vanni TM, Ramakrishnan R, Ginsberg HN. Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest* 1993 Apr;91(4):1743-52.

142. Howard BV. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 1999 Jul 8;84(1A):28J-32J.
143. Hsu KT, Storch J. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem*. 1996 Jun 7;271(23):13317-23.
144. Hunter SJ, Garvey WT. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med*. 1998 Oct;105(4):331-45.
145. Hutton JC. Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia*. 1994 Sep;37 Suppl 2:S48-56.
146. Hypertension in Diabetes Study (HDS): I. Prevalence of hypertension in newly presenting type 2 diabetic patients and the association with risk factors for cardiovascular and diabetic complications. *J Hypertens* 1993 Mar;11(3):309-17.
147. Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, Hansen LL, Busch AK, Hansen BF, Shafrir E, Mosthaf-Seedorf L. Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in *Psammomys obesus*: overexpression of protein kinase C epsilon in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes* 2001 Mar;50(3):584-92.
148. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation*. 1998 Apr 21;97(15):1440-5.
149. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 Sep 12;352(9131):837-53.

150. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 1996 May 3;272(5262):728-31.
151. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001 Apr;24(4):683-9.
152. Jamil H, Gordon DA, Eustice DC, Brooks CM, Dickson JK Jr, Chen Y, Ricci B, Chu CH, Harrity TW, Ciosek CP Jr, Biller SA, Gregg RE, Wetterau JR. An inhibitor of the microsomal triglyceride transfer protein inhibits apoB secretion from HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15;93(21):11991-5.
153. Jorns A, Tiedge M, Ziv E, Shafrir E, Lenzen S. Gradual loss of pancreatic beta-cell insulin, glucokinase and GLUT2 glucose transporter immunoreactivities during the time course of nutritionally induced type-2 diabetes in *Psammomys obesus* (sand rat). *Virchows Arch* 2002 Jan;440(1):63-9.
154. Jung RT. Obesity as a disease. *Br Med Bull* 1997;53(2):307-21.
155. Junquero D, Bruniquel F, N'Guyen X, Autin JM, Patoiseau JF, Degryse AD, Colpaert FC, Delhon A. F 12511, a novel ACAT inhibitor, and atorvastatin regulate endogenous hypercholesterolemia in a synergistic manner in New Zealand rabbits fed a casein-enriched diet. *Atherosclerosis*. 2001 Mar;155(1):131-42.
156. Kahn AM, Seidel CL, Allen JC, O'Neil RG, Shelat H, Song T. Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1993 Nov;22(5):735-42.

157. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(4):473-81.
158. Kahn C.R., Weir G.C. *Joslin's Diabetes Mellitus*, thirteenth edition, 1994.
159. Kahn CR, Folli F. Molecular determinants of insulin action. *Horm Res* 1993;39 Suppl 3:93-101 7.
160. Kalderon B, Adler JH, Levy E, Gutman A. Lipogenesis in the sand rat (*Psammomys obesus*). *Am J Physiol* 1983 May;244(5):E480-6.
161. Kalderon B, Gutman A, Levy E, Shafrir E, Adler JH. Characterization of stages in development of obesity-diabetes syndrome in sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetes* 1986 Jun;35(6):717-24.
162. Kalman R, Adler JH, Lazarovici G, Bar-On H, Ziv E. The efficiency of sand rat metabolism is responsible for development of obesity and diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1993 Apr-Jun;4(1-2):57-68.
163. Kalman R, Ziv E, Shafrir E, Bar-On H, Perez R. *Psammomys obesus* and the albino rat--two different models of nutritional insulin resistance, representing two different types of human populations. *Lab Anim* 2001 Oct;35(4):346-52.
164. Kanai F, Ito K, Todaka M, Hayashi H, Kamohara S, Ishii K, Okada T, Hazeki O, Ui M, Ebina Y. Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Sep 15;195(2):762-8.
165. Kaneko T, Wada H, Wakita Y, Minamikawa K, Nakase T, Mori Y, Deguchi K, Shirakawa S. Enhanced tissue factor activity and plasminogen activator inhibitor-1 antigen in human umbilical vein endothelial cells incubated with lipoproteins. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994 Jun;5(3):385-92.

166. Kanety H, Moshe S, Shafrir E, Lunenfeld B, Karasik A. Hyperinsulinemia induces a reversible impairment in insulin receptor function leading to diabetes in the sand rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar 1;91(5):1853-7.
167. Karpe F, Steiner G, Uffelman K, Olivecrona T, Hamsten A. Postprandial lipoproteins and progression of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1994 Mar;106(1):83-97.
168. Kasim-Karakas SE, Vriend H, Almario R, Chow LC, Goodman MN. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med*. 1996 Aug;128(2):208-13.
169. Katsurada A, Iritani N, Fukuda H, Matsumura Y, Nishimoto N, Noguchi T, Tanaka T. Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver. *Eur J Biochem*. 1990 Jun 20;190(2):427-33.
170. Katsurada A, Iritani N, Fukuda H, Matsumura Y, Nishimoto N, Noguchi T, Tanaka T. Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat liver. *Eur J Biochem*. 1990 Jun 20;190(2):435-41.
171. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992 Nov;41(11):1422-8.
172. Kelley DE, Mokan M, Mandarino LJ. Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. *Diabetes*. 1992 Jun;41(6):698-706.

173. Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by insulin. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:321-48.
174. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998 Sep;21(9):1414-31.
175. Klein RL, Lyons TJ, Lopes-Virella MF. Metabolism of very low- and low-density lipoproteins isolated from normolipidaemic type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients by human monocyte-derived macrophages. *Diabetologia* 1990 May;33(5):299-305.
176. Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 1990 Mar;13(3):228-43.
177. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000 Apr 6;404(6778):635-43.
178. Koskinen P, Manttari M, Manninen V, Huttunen JK, Heinonen OP, Frick MH. Coronary heart disease incidence in NIDDM patients in the Helsinki Heart Study. *Diabetes Care.* 1992 Jul;15(7):820-5.
179. Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res.* 2002 Oct;43(10):1585-94.
180. Kruszynska YT, Mulford MI, Baloga J, Yu JG, Olefsky JM. Regulation of skeletal muscle hexokinase II by insulin in nondiabetic and NIDDM subjects. *Diabetes.* 1998 Jul;47(7):1107-13.

181. Ktorza A, Bernard C, Parent V, Penicaud L, Froguel P, Lathrop M, Gauguier D. Are animal models of diabetes relevant to the study of the genetics of non-insulin-dependent diabetes in humans? *Diabetes Metab* 1997 Mar;23 Suppl 2:38-46.
182. Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. *Diabetes* 1992 Sep;41(9):1076-83.
183. Lamarche B, Tchernof A, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Fasting insulin and apolipoprotein B levels and low-density lipoprotein particle size as risk factors for ischemic heart disease. *JAMA* 1998 Jun 24;279(24):1955-61.
184. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997 Jan 7;95(1):69-75.
185. Lang DA, Matthews DR, Burnett M, Turner RC. Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes*. 1981 May;30(5):435-9.
186. Lang J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem*. 1999 Jan;259(1-2):3-17.
187. Large V, Arner P. Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab* 1998 Nov;24(5):409-18.
188. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*. 2001 Mar;24(3):588-97.
189. Lean ME, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ*. 1995 Jul 15;311(6998):158-61.

190. Lean ME, Han TS, Seidell JC. Impairment of health and quality of life in people with large waist circumference. *Lancet*. 1998 Mar 21;351(9106):853-6.
191. Lefèvre, P.J. Glucagon and its family revisited. *Diabetes Care*. 1995 May;18(5):715-30.
192. Lehner R, Kuksis A. Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog Lipid Res*. 1996;35(2):169-201.
193. Leibowitz G, Yuli M, Donath MY, Nesher R, Melloul D, Cerasi E, Gross DJ, Kaiser N. Beta-cell glucotoxicity in the Psammomys obesus model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2001 Feb;50 Suppl 1:S113-7.
194. Leung GK, Veniant MM, Kim SK, Zlot CH, Raabe M, Bjorkegren J, Neese RA, Hellerstein MK, Young SG. A deficiency of microsomal triglyceride transfer protein reduces apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem* 2000 Mar 17;275(11):7515-20.
195. Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 1995 May;9(8):626-35.
196. Lewis GF, O'Meara NM, Soltys PA, Blackman JD, Iverius PH, Pugh WL, Getz GS, Polonsky KS. Fasting hypertriglyceridemia in noninsulin-dependent diabetes mellitus is an important predictor of postprandial lipid and lipoprotein abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 1991 Apr;72(4):934-44.
197. Lewis GF, Steiner G. Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care* 1996 Apr;19(4):390-3.

198. Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP. Endothelium-dependent relaxation by acetylcholine is impaired in hypertriglyceridemic humans with normal levels of plasma LDL cholesterol. *J Am Coll Cardiol* 1999 Mar;33(3):805-12.
199. Li X, Catalina F, Grundy SM, Patel S. Method to measure apolipoprotein B-48 and B-100 secretion rates in an individual mouse: evidence for a very rapid turnover of VLDL and preferential removal of B-48- relative to B-100-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 1996 Jan;37(1):210-20.
200. Liao W, Kobayashi K, Chan L. Adenovirus-mediated overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP): mechanistic studies on the role of MTP in apolipoprotein B-100 biogenesis. *Biochemistry* 1999 Jun 8;38(23):7532-44.
201. Lignes directrices de pratique clinique 1998 pour le traitement du diabète au Canada. Supplément du JAMC 1998; 159(8suppl) : S1-S31.
202. Lillioja S, Mott DM, Howard BV, Bennett PH, Yki-Jarvinen H, Freymond D, Nyomba BL, Zurlo F, Swinburn B, Bogardus C. Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *N Engl J Med*. 1988 May 12;318(19):1217-25.
203. Litherland GJ, Hajdich E, Hundal HS. Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues. *Mol Membr Biol*. 2001 Jul-Sep;18(3):195-204.
204. Long H. Les complications chroniques du diabète: quand prévenir vaut mieux que guérir. *Le clinicien*. 2001 Fèv : 111-122.
205. Lopes-Virella MF, Klein RL, Lyons TJ, Stevenson HC, Witztum JL. Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Diabetes*. 1988 May;37(5):550-7.

206. Luc G., Lecerf J., Bard J.-M., Hachulla E., Fruchart J.-C., Devulder B. Cholestérol et athérosclérose. Édition Masson 1991.
207. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):233-41.
208. Lyons RT, Nordeen SK, Young DA. Effects of fasting and insulin administration on polyribosome formation in rat epididymal fat cells. *J Biol Chem*. 1980 Jul 10;255(13):6330-4.
209. Lyons TJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes* 1992 Oct;41 Suppl 2:67-73.
210. Maclean PS, Tanner CJ, Houmard JA, Barakat HA. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity is not linked to insulin sensitivity. *Metabolism* 2001 Jul;50(7):783-8.
211. Makita T, Tanaka A, Nakano T, Nakajima K, Numano F. Importance of glycation in the acceleration of low density lipoprotein (LDL) uptake into macrophages in patients with diabetes mellitus. *Int Angiol*. 1999 Jun;18(2):149-53.
212. Malmstrom R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Jarvinen H, Shepherd J, Taskinen MR. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* 1997 Apr;40(4):454-62.
213. Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991 Dec;88(6):2059-66.
214. Marquie G, Duhault J, Hadjiisky P, Petkov P, Bouissou H. Diabetes mellitus in sand rats (*Psammomys obesus*): microangiopathy during development of the diabetic syndrome. *Cell Mol Biol* 1991;37(6):651-67.

215. Marquie G, Hadjiisky P, Arnaud O, Duhault J. Development of macroangiopathy in sand rats (*Psammomys obesus*), an animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of gliclazide. *Am J Med* 1991 Jun 24;90(6A):55S-61S.
216. Mason TM. The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1998 Dec;35(6):461-87.
217. Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990 Jun;39(6):647-52.
218. Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev* 2000 Dec;21(6):585-618.
219. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.
220. Meraji, S., Jayakody, L., Senaratne, M.P.J., Thomson, A.B.R., Kappagoda, T., 1987. Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat. *Diabetes* 36, 978-981.
221. Meyer L, Guerci B, Ziegler O, Drouin P. Insuline dans le traitement du diabète de type 2. *Rev Prat* 1999 Jan 1;49(1):51-5.
222. Mitchell DM, Zhou M, Pariyarath R, Wang H, Aitchison JD, Ginsberg HN, Fisher EA. Apoprotein B100 has a prolonged interaction with the translocon during which its lipidation and translocation change from dependence on the microsomal triglyceride transfer protein to independence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14733-8.

223. Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*. 2000 Jun;49(6):883-8.
224. Moro E, Alessandrini P, Zambon C, Pianetti S, Pais M, Cazzolato G, Bon GB. Is glycation of low density lipoproteins in patients with Type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? *Diabet Med* 1999 Aug;16(8):663-9.
225. Moustaid N, Jones BH, Taylor JW. Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J Nutr*. 1996 Apr;126(4):865-70.
226. Musanti R, Giorgini L, Lovisolo PP, Pirillo A, Chiari A, Ghiselli G. Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase decreases apolipoprotein B-100-containing lipoprotein secretion from HepG2 cells. *J Lipid Res*. 1996 Jan;37(1):1-14.
227. Mykkanen L, Kuusisto J, Pyorala K, Laakso M. Cardiovascular disease risk factors as predictors of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in elderly subjects. *Diabetologia* 1993 Jun;36(6):553-9.
228. Nakai N, Collier GR, Sato Y, Oshida Y, Fujitsuka N, Shimomura Y. Activities of liver pyruvate dehydrogenase complex and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in sand rat (*Psammomys obesus*). *Life Sci* 1997;60(1):51-5.
229. Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, Kawata T, Koike T. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes* 1997 May;46(5):895-9.
230. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993 Jun 10;328(23):1676-85.

231. Nesher R, Gross DJ, Donath MY, Cerasi E, Kaiser N. Interaction between genetic and dietary factors determines beta-cell function in *Psammomys obesus*, an animal model of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999 Apr;48(4):731-7.
232. Nesher R, Warwar N, Khan A, Efendic S, Cerasi E, Kaiser N. Defective stimulus-secretion coupling in islets of *Psammomys obesus*, an animal model for type 2 diabetes. *Diabetes* 2001 Feb;50(2):308-14.
233. Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:689-719.
234. Nigon F, Lesnik P, Rouis M, Chapman MJ. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J Lipid Res.* 1991 Nov;32(11):1741-53.
235. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E, Attali JR. Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes* 1993 Jul;42(7):1017-25.
236. Nitenberg A. L'endothélium vasculaire : un organe cible du diabète. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2002 Apr;63(2 Pt 2):1S13-7.
237. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2002 Mar;161(1):1-16.
238. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, Seedorf U, Assmann G. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem* 2001 Sep 14;276(37):34480-5.

239. Nospikel T, Iynedjian PB. Insulin signalling and regulation of glucokinase gene expression in cultured hepatocytes. *Eur J Biochem.* 1992 Nov 15;210(1):365-73.
240. O'Brien RM, Lucas PC, Forest CD, Magnuson MA, Granner DK. Identification of a sequence in the PECK gene that mediates a negative effect of insulin on transcription. *Science.* 1990 Aug 3;249(4968):533-7.
241. O'Callaghan BL, Koo SH, Wu Y, Freake HC, Towle HC. Glucose regulation of the acetyl-CoA carboxylase promoter PI in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 2001 May 11;276(19):16033-9.
242. O'Dea K, Traianedes K, Hopper JL, Larkins RG. Impaired glucose tolerance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in Australian Aborigines from the desert. *Diabetes Care* 1988;11:23-29.
243. O'Dea K. Marked improvement in carbohydrate and lipid metabolism in diabetic Australian aborigines after temporary reversion to traditional lifestyle. *Diabetes.* 1984 Jun;33(6):596-603. 7
244. Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem.* 1994 Feb 4;269(5):3568-73.
245. Okura Y, Brink M, Itabe H, Scheidegger KJ, Kalangos A, Delafontaine P. Oxidized low-density lipoprotein is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000 Nov 28;102(22):2680-6.
246. Olsen MH, Andersen UB, Wachtell K, Ibsen H, Dige-Petersen H. A possible link between endothelial dysfunction and insulin resistance in hypertension. *A LIFE*

- substudy. Losartan Intervention For Endpoint-Reduction in Hypertension. Blood Press 2000;9(2-3):132-9.
247. O'Meara NM, Sturis J, Van Cauter E, Polonsky KS. Lack of control by glucose of ultradian insulin secretory oscillations in impaired glucose tolerance and in non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest. 1993 Jul;92(1):262-71.
 248. O'Meara NMG, Devery RAM, Owen D, Collins PB, Johnson AH, Tomkin GH. Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits. Diabetes 1990;29:626-633.
 249. Ong JM, Kern PA. Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. J Clin Invest 1989 Jul;84(1):305-11.
 250. Ooyen C, Zecca A, Zanelli T, Catapano AL. Decreased intracellular degradation and increased secretion of apo B-100 in Hep G2 cells after inhibition of cholesteryl ester synthesis. Atherosclerosis. 1997 Apr;130(1-2):143-52.
 251. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997 Dec;17(12):3542-56.
 252. Perz M, Torlinska T. Insulin receptor--structural and functional characteristics. Med Sci Monit. 2001 Jan-Feb;7(1):169-77.
 253. Peterson RG, Shaw WN, Neel MA, Little LA, Eichberg J. Zucker Diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent Diabetic Mellitus. ILAR News 1990, 32 (3):16-19.
 254. Phan CT, Tso P. Intestinal lipid absorption and transport. Front Biosci 2001 Mar 1;6:D299-319.

255. Phillips C, Bennett A, Anderton K, Owens D, Collins P, White D, Tomkin GH. Intestinal rather than hepatic microsomal triglyceride transfer protein as a cause of postprandial dyslipidemia in diabetes. *Metabolism* 2002 Jul;51(7):847-52.
256. Picard F, Naimi N, Richard D, Deshaies Y. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 1999 Mar;48(3):452-9.
257. Polonsky KS, Rubenstein AH. C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin. Pitfalls and limitations. *Diabetes*. 1984 May;33(5):486-94.
258. Porte D.Jr., Sherwin R.S. *Ellenberg & Rifkin's Diabetes Mellitus*, fifth edition, 1997.
259. Poston WS 2nd, Foreyt JP. Obesity is an environmental issue. *Atherosclerosis*. 1999 Oct;146(2):201-9.
260. Pradines-Figueres A, Vannier C, Ailhaud G. Short-term stimulation by insulin of lipoprotein lipase secretion in adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Aug 15;154(3):982-90.
261. Quinn L. Type 2 diabetes: epidemiology, pathophysiology, and diagnosis. *Nurs Clin North Am*. 2001 Jun;36(2):175-92.
262. Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL, Young SG. Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8686-91.
263. Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, Wong JS, Hamilton RL, Young SG. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest*. 1999 May;103(9):1287-98.

264. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;i: 785-789.
265. Ravussin E, Valencia ME, Esparza J, Bennett PH, Schulz LO. Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima Indians. *Diabetes Care*. 1994 Sep;17(9):1067-74.
266. Reaven GM. Insulino-résistance: pourquoi est-il important de la traiter. *Diabetes Metab*. 2001 Apr;27(2 Pt 2):247-53.
267. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988 Dec;37(12):1595-607.
268. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2000 Jan;23 Suppl 1:S4-19.
269. Richards EG, Grundy SM, Cooper K. Influence of plasma triglycerides on lipoprotein patterns in normal subjects and in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1989 May 15;63(17):1214-20.
270. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996 Jun 15;97(12):2859-65.
271. Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2000 Aug;151(2):357-79.
272. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.

273. Russell DW. Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 1992 Apr;6(2):103-10.
274. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999 Aug;22(4):352-5.
275. Saad MF, Kahn SE, Nelson RG, Pettitt DJ, Knowler WC, Schwartz MW, Kowalyk S, Bennett PH, Porte D Jr. Disproportionately elevated proinsulin in Pima Indians with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 May;70(5):1247-53.
276. Saito F, Hori MT, Fittingoff M, Hino T, Tuck ML. Insulin attenuates agonist-mediated calcium mobilization in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1993 Sep;92(3):1161-7.
277. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):799-806.
278. Scheen AJ, Paquot N, Letiexhe MR, Castillo MJ, Lefebvre PJ. Comment évaluer la sensibilité à l'insuline en pratique ? *Diabete Metab* 1994 Nov-Dec;20(6):556-61.
279. Schmidt-Nielsen K, Haines HB, Heckel DB. Diabetes mellitus in the sand rat induced by standard laboratory diets. *Sciences* 1964;164:489-90.
280. Schudt. C. Influence of insulin, glucocorticoids and glucose on glycogen synthase activity in hepatocyte cultures. *Biochim Biophys Acta*. 1980 May 22;629(3):499-509.
281. Scott LM, Tomkin GH. Changes in hepatic and intestinal cholesterol regulatory enzymes: the influence of metformin. *Biochem Pharmacol* 1983;32:827-830.

282. Shafrir E, Gutman A. Psammomys obesus of the Jerusalem colony: a model for nutritionally induced, non-insulin-dependent diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1993 Apr-Jun;4(1-2):83-99.
283. Shafrir E. Development and consequences of insulin resistance: lessons from animals with hyperinsulinaemia. *Diabetes Metab.* 1996 Apr;22(2):122-31.
284. Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil CM, Turck CW, Bouma ME, Rader DJ, et al. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature* 1993 Sep 2;365(6441):65-9.
285. Shefer S, Hauser S, Bekersky I, Mosbach EH. Biochemical site of regulation of bile acid synthesis in the rat. *J Lipid Res* 1970;11:404-411.
286. Shepard TY, Weil KM, Sharp TA, Grunwald GK, Bell ML, Hill JO, Eckel RH. Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. *Am J Clin Nutr.* 2001 Apr;73(4):703-8.
287. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med.* 1990 Jan 25;322(4):223-8.
288. Simon BC, Cunningham LD, Cohen RA. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J Clin Invest* 1990 Jul;86(1):75-9.
289. Smith SR. The endocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996 Dec;25(4):921-42.

290. Sobenin IA, Tertov VV, Koschinsky T, Bunting CE, Slavina ES, Dedov II, Orekhov AN. Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells. *Atherosclerosis* 1993 Apr;100(1):41-54.
291. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991 Oct;40(10):1328-34.
292. Sparks JD, Sparks CE. Obese Zucker (fa/fa) rats are resistant to insulin's inhibitory effect on hepatic apo B secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Nov 30;205(1):417-22.
293. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. 1993 Feb;16(2):434-44.
294. Standley PR, Zhang F, Ram JL, Zemel MB, Sowers JR. Insulin attenuates vasopressin-induced calcium transients and a voltage-dependent calcium response in rat vascular smooth muscle cells. : *J Clin Invest* 1991 Oct;88(4):1230-6.
295. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996 Jun 1;97(11):2601-10.
296. Steiner G, Lewis GF. Hyperinsulinemia and triglyceride-rich lipoproteins. *Diabetes* 1996 Jul;45 Suppl 3:S24-6.

297. Steiner G, Tkac I, Uffelman KD, Lewis GF. Important contribution of lipoprotein particle number to plasma triglyceride concentration in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 1998 Mar;137(1):211-4.
298. Stern MP, Patterson JK, Haffner SM, Hazuda HP, Mitchell BD. Lack of awareness and treatment of hyperlipidemia in type II diabetes in a community survey. *JAMA*. 1989 Jul 21;262(3):360-4.
299. Stiko-Rahm A, Wiman B, Hamsten A, Nilsson J. Secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured human umbilical vein endothelial cells is induced by very low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*. 1990 Nov-Dec;10(6):1067-73.
300. St-Louis, J. Sicotte, B., 1992. Prostaglandin- or endothelium-mediated vasodilation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166, 684-692.
301. Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jun 26;1486(1):28-44.
302. Streeper RS, Svitek CA, Chapman S, Greenbaum LE, Taub R, O'Brien RM. A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J Biol Chem*. 1997 May 2;272(18):11698-701.
303. Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD. Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest*. 1985 Mar;75(3):1068-76.
304. Subbiah MTR, Yunker RL. Cholesterol 7 α -hydroxylase of rat liver: an insulin sensitive enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;124:896-902.

305. Suc I, Escargueil-Blanc I, Troly M, Salvayre R, Negre-Salvayre A. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Oct;17(10):2158-66.
306. Sul HS, Wang D. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr.* 1998;18:331-51.
307. Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. New connections in the regulation of PEPCCK gene expression by insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996 Feb 29;351(1336):191-9.
308. Swinburn BA, Boyce VL, Bergman RN, Howard BV, Bogardus C. Deterioration in carbohydrate metabolism and lipoprotein changes induced by modern, high fat diet in Pima Indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:156-165.
309. Syvanne M, Ahola M, Lahdenpera S, Kahri J, Kuusi T, Virtanen KS, Taskinen MR. High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Lipid Res* 1995 Mar;36(3):573-82.
310. Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF, Adeli K. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem.* 2000 Mar 24;275(12):8416-25.
311. Takeda J, Kayano T, Fukumoto H, Bell GI. Organization of the human GLUT2 (pancreatic beta-cell and hepatocyte) glucose transporter gene. *Diabetes.* 1993 May;42(5):773-7.

312. Tan KC, Cooper MB, Ling KL, Griffin BA, Freeman DJ, Packard CJ, Shepherd J, Hales CN, Betteridge DJ. Fasting and postprandial determinants for the occurrence of small dense LDL species in non-insulin-dependent diabetic patients with and without hypertriglyceridaemia: the involvement of insulin, insulin precursor species and insulin resistance. *Atherosclerosis* 1995 Mar;113(2):273-87.
313. Taskinen MR, Beltz WF, Harper I, Fields RM, Schonfeld G, Grundy SM, Howard BV. Effects of NIDDM on very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B metabolism. Studies before and after sulfonylurea therapy. *Diabetes* 1986 Nov;35(11):1268-77.
314. Taskinen MR, Smith U. Lipid disorders in NIDDM: implications for treatment. *J Intern Med* 1998 Nov;244(5):361-70.
315. Tato F, Vega GL, Grundy SM. Determinants of plasma HDL-cholesterol in hypertriglyceridemic patients. Role of cholesterol-ester transfer protein and lecithin cholesteryl acyl transferase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Jan;17(1):56-63.
316. Taylor PD, Oon BB, Thomas CR, Poston L. Prevention by insulin treatment of endothelial dysfunction but not enhanced noradrenaline-induced contractility in mesenteric resistance arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1994 Jan;111(1):35-41.
317. Taylor, P.D., Wickenden, A.D., Mirrlees, D.J., Poston, L., 1994. Endothelial function in the isolated perfused mesentery and aortae of rats with streptozotocin-induced diabetes: effect of treatment with the aldose reductase inhibitor, ponalrestat. *Br. J. Pharmacol.* 111, 42-48.
318. Tietge UJ, Bakillah A, Maugeais C, Tsukamoto K, Hussain M, Rader DJ. Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in

- increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1999 Nov;40(11):2134-9.
319. Touyz RM, Tolloczko B, Schiffrin EL. Insulin attenuates agonist-evoked calcium transients in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1994 Jan;23(1 Suppl):I25-8.
 320. Triau JE, Arbetter J, Schaefer EJ. Impaired hepatocyte binding, uptake and degradation of glucosylated low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1986 Jul 18;877(3):359-65.
 321. Truett GE, Bahary N, Friedman JM, Leibel RL. Rat obesity gene fatty (fa) maps to chromosome 5: evidence for homology with the mouse gene diabetes (db). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 1;88(17):7806-9.
 322. Turner NC, Gudgeon C, Toseland N. Effects of genetic hyperinsulinaemia on vascular reactivity, blood pressure, and renal structure in the Zucker rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995 Nov;26(5):714-20.
 323. Turner, N.C., White, P., 1996. Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinaemic obese Zucker rats. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 27, 884-890.
 324. Twisk J, Hoekman MFM, Lehmann EM, Meizer P, Mager WH, Princen HMG. Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription. *Hepatology* 1995;21:501-510.
 325. Uchida K, Takase H, Kadowaki M, Nomura Y, Matsubara T, Takeuchi N. Altered bile acid metabolism in alloxan diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 1979;29:553-562.

326. Utkan T, Sarioglu Y, Yildirim S. Impaired contraction and relaxation in the aorta of streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacology* 1998 Apr;56(4):207-15.
327. Utriainen T, Makimattila S, Virkamaki A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H. Dissociation between insulin sensitivity of glucose uptake and endothelial function in normal subjects. *Diabetologia*. 1996 Dec;39(12):1477-82.
328. Uusitupa MI, Niskanen LK, Siitonen O, Voutilainen E, Pyorala K. Ten-year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 1993 Nov;36(11):1175-84.
329. Voque, J. La différenciation sexuelle - facteur déterminant de l'obésité. *Press Mes*.1947 30,339-340.
330. van Greevenbroek MM, Robertus-Teunissen MG, Erkelens DW, de Bruin TW. Participation of the microsomal triglyceride transfer protein in lipoprotein assembly in Caco-2 cells: interaction with saturated and unsaturated dietary fatty acids. *J Lipid Res*. 1998 Jan;39(1):173-85.
331. van Haeften TW, Dubbeldam S, Zonderland ML, Erkelens DW. Insulin secretion in normal glucose-tolerant relatives of type 2 diabetic subjects. Assessments using hyperglycemic glucose clamps and oral glucose tolerance tests. *Diabetes Care*. 1998 Feb;21(2):278-82.
332. Van Steenbergen W, Lanckmans S. Liver disturbances in obesity and diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995 Sep;19 Suppl 3:S27-36.
333. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990 Jul 5;323(1):27-36.

334. Vassileva G, Huwyler L, Poirier K, Agellon LB, Toth MJ. The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J*. 2000 Oct;14(13):2040-6.
335. Vergès B. I. Dyslipidaemia in diabetes mellitus. Review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis. *Diabetes Metab* 1999 Jun;25 Suppl 3:32-40.
336. Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 2001;22:355-75.
337. Vlahcevic ZR, Hylemon PB, Chiang JYL. Chapter 22, Hepatic Cholesterol Metabolism In: *The liver : Biology and pathophysiology*, Third Edition., edited by Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA. Reaven Press, 1994: 379-389.
338. Vlahcevic ZR, Pandak WM, Heuman DM, Hylemon PB. Function and regulation of hydroxylases involved in the bile acid biosynthesis pathways. *Semin Liver Dis* 1992 Nov;12(4):403-19.
339. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 Jan;21(1):13-27.
340. Wada H, Kaneko T, Wakita Y, Minamikawa K, Nagaya S, Tamaki S, Deguchi K, Shirakawa S. Effect of lipoproteins on tissue factor activity and PAI-II antigen in human monocytes and macrophages. *Int J Cardiol* 1994 Dec;47(1 Suppl):S21-5.
341. Wahren J, Ekberg K, Johansson J, Henriksson M, Pramanik A, Johansson BL, Rigler R, Jornvall H. Role of C-peptide in human physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 May;278(5):E759-68.

342. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000 Dec;21(6):697-738.
343. Wang Y, McLeod RS, Yao Z. Normal activity of microsomal triglyceride transfer protein is required for the oleate-induced secretion of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B from McA-RH7777 cells. *J Biol Chem.* 1997 May 9;272(19):12272-8.
344. Wannamethee SG, Shaper AG. Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999 Aug;22(8):1266-72.
345. Wareham NJ, Byrne CD, Williams R, Day NE, Hales CN. Fasting proinsulin concentrations predict the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999 Feb;22(2):262-70.
346. Watanabe J, Wohltmann HJ, Klein RL, Colwell JA, Lopes-Virella MF. Enhancement of platelet aggregation by low-density lipoproteins from IDDM patients. *Diabetes* 1988 Dec;37(12):1652-7.
347. Watson TD, Caslake MJ, Freeman DJ, Griffin BA, Hinnie J, Packard CJ, Shepherd J. Determinants of LDL subfraction distribution and concentrations in young normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb* 1994 Jun;14(6):902-10.
348. Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care.* 1998, Jul;21(7):1167-72.
349. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes.* 2001 Feb;50 Suppl 1:S154-9.

350. Weissberg P. Mechanisms modifying atherosclerotic disease - from lipids to vascular biology. *Atherosclerosis*. 1999 Sep 9;147 Suppl 1:S3-10.
351. Weisweiler P, Schwandt P. Type 1 (insulin-dependent) versus type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: characterization of serum lipoprotein alterations. *Eur J Clin Invest* 1987 Feb;17(1):87-91.
352. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992 Nov 6;258(5084):999-1001.
353. Wetterau JR, Gregg RE, Harrity TW, Arbeeny C, Cap M, Connolly F, Chu CH, George RJ, Gordon DA, Jamil H, Jolibois KG, Kunselman LK, Lan SJ, Maccagnan TJ, Ricci B, Yan M, Young D, Chen Y, Fryszman OM, Logan JV, Musial CL, Poss MA, Robl JA, Simpkins LM, Biller SA, et al. An MTP inhibitor that normalizes atherogenic lipoprotein levels in WHHL rabbits. *Science* 1998 Oct 23;282(5389):751-4.
354. Wetterau JR, Lin MC, Jamil H. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 1997 Apr 1;1345(2):136-50.
355. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994 Jan 7;269(1):1-4.
356. Whitelaw DC, Gilbey SG. Insulin resistance. *Ann Clin Biochem*. 1998 Sep;35 (Pt 5):567-83.
357. Wideman L, Kaminsky LA, Whaley MH. Postprandial lipemia in obese men with abdominal fat patterning. *J Sports Med Phys Fitness* 1996 Sep;36(3):204-10.

358. Williams B, Schrier RW. Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1992 Nov;41(11):1464-72.
359. Williams KV, Price JC, Kelley DE. Interactions of impaired glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle insulin resistance: a dose-response assessment using positron emission tomography. *Diabetes*. 2001 Sep;50(9):2069-79.
360. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996 Mar 1;27(3):567-74.
361. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998 May 5;97(17):1695-701.
362. Wilson PW, Kannel WB, Anderson KM. Lipids, glucose intolerance and vascular disease: the Framingham Study. *Monogr Atheroscler* 1985;13:1-11.
363. Wilson PW. Diabetes mellitus and coronary heart disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001 Dec;30(4):857-81.
364. Wing RR, Blair EH, Bononi P, Marcus MD, Watanabe R, Bergman RN. Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. *Diabetes Care*. 1994 Jan;17(1):30-6.
365. Witztum JL, Mahoney EM, Branks MJ, Fisher M, Elam R, Steinberg D. Nonenzymatic glucosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* 1982 Apr;31(4 Pt 1):283-9.

366. World Health Organisation. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and its Complications. Part 1 : Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva, 1999.
367. World Health Organisation. Obesity : Preventing and Managing the Global Epidemic. WHO Obesity Technical Report Series 894. Geneva, Switzerland : World Health Organisation; 2000.
368. Yamada K, Noguchi T, Miyazaki J, Matsuda T, Takenaka M, Yamamura K, Tanaka T. Tissue-specific expression of rat pyruvate kinase L/chloramphenicol acetyltransferase fusion gene in transgenic mice and its regulation by diet and insulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Aug 31;171(1):243-9.
369. Yeung SJ, Chen SH, Chan L. Ubiquitin-proteasome pathway mediates intracellular degradation of apolipoprotein B. *Biochemistry*. 1996 Oct 29;35(43):13843-8.
370. Yoshioka N, Kuzuya T, Matsuda A, Taniguchi M, Iwamoto Y. Serum proinsulin levels at fasting and after oral glucose load in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1988 Jun;31(6):355-60.
371. Young NL, Saudek CD, Crawford SA. Total hydroxymethylglutaryl CoA reductase activity in the small intestine and liver of insulin-deficient rats. *J Lipid Res* 1982 Feb;23(2):266-75.
372. Zambon A, Austin MA, Brown BG, Hokanson JE, Brunzell JD. Effect of hepatic lipase on LDL in normal men and those with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1993 Feb;13(2):147-53.
373. Zemel MB, Johnson BA, Ambrozy SA. Insulin-stimulated vascular relaxation. Role of Ca(2+)-ATPase. *Am J Hypertens* 1992 Sep;5(9):637-41.

374. Zemel, M.B., Reddy, S., Sowers, J.R., 1991. Insulin attenuation of vasoconstrictor responses to phenylephrine in Zucker lean and obese rats. *Am. J. Hypertens.* 4, 537-539.
375. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
376. Zhang Z, Cianflone K, Sniderman AD. Role of cholesterol ester mass in regulation of secretion of ApoB100 lipoprotein particles by hamster hepatocytes and effects of statins on that relationship. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Mar;19(3):743-52.
377. Zhou Z, Luchoomun J, Bakillah A, Hussain MM. Lysophosphatidylcholine increases apolipoprotein B secretion by enhancing lipid synthesis and decreasing its intracellular degradation in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Mar 6;1391(1):13-24.
378. Zierath JR, Livingston JN, Thorne A, Bolinder J, Reynisdottir S, Lonnqvist F, Arner P. Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. *Diabetologia.* 1998 Nov;41(11):1343-54.
379. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001 Dec 13;414(6865):782-7.
380. Ziv E, Kalman R, HersHKop K, Barash V, Shafrir E, Bar-On H. Insulin resistance in the NIDDM model *Psammomys obesus* in the normoglycaemic, normoinsulinaemic state. *Diabetologia* 1996 Nov;39(11):1269-75.

381. Ziv E, Shafrir E. *Psammomys obesus* (sans rat): nutritionnally induced NIDDM-like syndrom on a “thrifty gene” backgrounde. In : Shafrir E, ed., *Lessons from animal diabetes*, London, Smith-Gordon, 1996, 5, 285-300.

